生命科学实验指南系列

上皮细胞培养指南

〔英〕克莱尔·怀斯　主编

段恩奎　王莉　主译　王建辰　主审



科学出版社

www.sciencep.com

(Q-1622.0101)

上皮细胞培养指南



销售分类建议：生物医学/生物科学/细胞生物学

生命科学编辑部
联系电话：010-64012501
http://www.lifescience.com.cn
e-mail：spbio@163.net

ISBN 7-03-016050-9
定 价：62.00 元

生命科学实验指南系列

上皮细胞培养指南

〔英〕克莱尔·怀斯　主编
段恩奎　王　莉　主译
王建辰　主审

科学出版社
北京

图字：01-2003-4113

内 容 简 介

近十年来，上皮细胞分离和培养的研究取得了重大进展，涌现出许多新技术。本书涵盖了常规方法和专业方法，藉此为多种上皮细胞培养技术提供全面的、循序渐进的指导。书中内容包括不同组织和不同种属的原代细胞的建立和维持，重点介绍了对上皮细胞进行深入分析和检测的方法，如：对细胞凋亡和整联蛋白的分析，以及对膜电容和细胞生长融合的检测。应用不同的共培养技术，还可能开发出不同的体外研究系统。书中有些章节涉及了这一内容，如：血-脑屏障模型、研究上皮细胞与细菌相互作用的系统以及药物吸收模型。本书还介绍了上皮细胞培养应用于烧伤以及其他皮肤疾病的治疗。

本书适于初次接触上皮细胞培养领域、学习常规培养技术的人员参考，而且对那些需要更全面、更专业方法的研究人员以及临床医生也会有所帮助。

Epithelial Cell Culture Protocols

The original English language work has been published by HUMANA PRESS, Totowa, New Jersey, U. S. A

图书在版编目(CIP)数据

上皮细胞培养指南/(英)怀斯(Wise, C.)主编；段恩奎，王莉主译.—北京：科学出版社，2005

(生命科学实验指南系列)

ISBN 7-03-016050-9

I. 上… II. ①怀… ②段… ③王… III. 人体-细胞培养-指南 IV. Q813.1-62

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2005)第 086637 号

责任编辑：莫结胜 彭克里 席 慧/责任校对：张怡君

责任印制：钱玉芬/封面设计：耕者设计工作室

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码：100717

http://www.sciencep.com

新蕾印刷厂 印刷

科学出版社编务公司排版制作

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2005年10月第 一 版 开本：787×1092 1/16

2005年10月第一次印刷 印张：20

印数：1~2 500 字数：433 000

定价：62.00 元

(如有印装质量问题，我社负责调换〈环伟〉)

编　者

Per Artursson　瑞典乌普萨拉大学制药学部(Division of Pharmaceutics, Uppsala University, Uppsala, Sweden)

Carol A. Bertrand　美国宾夕法尼亚州匹兹堡医学院细胞生物学与生理学系(Department of Cell Biology and Physiology, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA)

Tsutomu Chiba　日本京都大学医学研究所肝胃肠病学系 (Department of Gastroenterology and Hepatology, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto, Japan)

Ben Forbes　英国伦敦皇家学院药学系 (Department of Pharmacy, King's College London, London, UK)

Rolf Gebhardt　德国莱比锡大学医学院生物化学研究所 (Institute of Biochemistry, Medical Faculty, University of Leipzig, Leipzig, Germany)

Andrew P. Gilmore　英国曼彻斯特大学生物科学院 (School of Biological Sciences, University of Manchester, Manchester, UK)

Johan Gråsjö　瑞典乌普萨拉大学制药学部 (Division of Pharmaceutics Uppsala University, Uppsala, Sweden)

Albert Guidry　美国农业部(美国马里兰贝兹维尔)免疫学与疾病防治实验室(Immunology and Disease Resistance Laboratory, US Department of Agriculture, Beltsville, MD)

Ken-Ichiro Hata　日本名古屋大学医学院组织工程系 (Department of Tissue Engineering, Nagoya University School of Medicine, Nagoya City, Japan)

Chieko Hemmi　日本东京大学健康服务中心 (Health Service Center, University of Tokyo, Tokyo, Japan)

Yoshitaka Hibino　日本名古屋大学医学院组织工程系 (Department of Tissue Engineering, Nagoya University School of Medicine, Nagoya City, Japan)

Kairbaan Hodivala-Dilke　英国伦敦 Richard Dimbleby 癌症研究部/皇家癌症基金，细胞黏附与疾病实验室 (Cell Adhesion and Disease Laboratory, The Richard Dimbleby Department of Cancer Research/Imperial Cancer Research Fund, London, UK)

Ulrich Hopfer　美国俄亥俄州 Case Western Reserve University 生理学与生物物理学系 (Department of Physiology and Biophysics, Case Western

Reserve University, Cleveland, OH)

Masayoshi Hosoda 日本仙台 Tohoku 医学院老年与呼吸医学系 (Department of Gericatric and Respiratory Medicine, Tohoku University School of Medicine, Sendai, Japan)

David L. Hudson 英国伦敦大学医学院泌尿学研究所 (UCLH Medical School, London, UK)

Nobuhiro Ibaraki 日本千叶日本医学院千叶 Hokusoh 医院眼科(Department of Ophthalmology, Chiba Hokusoh Hospital, Nippon Medical School, Chiba, Japan)

Nicola Jones 加拿大多伦多大学患病儿童医院研究所胃肠病与营养部 (Division of Gastroenterology and Nutrition, Research Institute, Hospital for Sick Children, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada)

Philip H. Karp 美国艾奥瓦州大学医学院内科系 Howard Hughes 医学所 (Howard Hughes Medical Institute, Department of Internal Medicine, University of Iowa College of Medicine, Iowa City, IA)

Yoshitaka Konda 日本京都大学医学研究所肝胃肠病学系 (Department of Gastroenterology and Hepatology, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto, Japan)

Norio Kumagai 日本川崎圣玛里娜大学医学院整形外科系 (Department of Plastic and Reconstructive Surgery, St. Marianna University School of Medicine, Kawasaki, Japan)

Janice L. Lanspach 美国艾奥瓦州大学医学院内科系 Howard Hughes 医学所 (Howard Hughes Medical Institute, Department of Internal Medicine, University of Iowa College of Medicine, Iowa City, IA)

Vincent H. L. Lee 美国南加利福尼亚大学洛杉矶分校药学院制药学系 (Pharmaceutical Research, School of Pharmacy, University of Southern California, Los Angeles, CA)

Simon A. Lewis 美国得克萨斯医学分院生理与生物物理学系 (Department of Physiology and Biophysics, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX)

Tohru Masui 日本国家健康科学研究所遗传学与变异学部 (Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan)

Derek M. McKay 加拿大汉密尔顿 McMaster 大学小肠疾病研究组 (Intestinal Disease Research Programme, McMaster University, Hamilton, Ontario, Canada)

Thomas O. Moninger 美国艾奥瓦州大学医学院电子显微镜系 (Central Electron Microscopy Facility, University of Iowa College of Medicine,

Iowa City, IA)

Tuua Mustonen — 芬兰赫尔辛基大学生物技术研究所 (Institute of Biotechnology, University of Helsinki, Helsinki, Finland)

Tamara S. Nesselhauf — 美国艾奥瓦州大学医学院内科系 (Department of Internal Medicine, University of Iowa College of Medicine, Iowa City, IA)

Celia O'Brien — 美国农业部(美国马里兰贝兹维尔)免疫学与疾病防治实验室 (Immunology and Disease Resistance Laboratory, US Department of Agriculture, Beltsville, MD)

Goran Ocklind — 瑞典乌普萨拉大学制药学部 (Division of Pharmaceutics, Uppsala University, Uppsala, Sweden)

Mary H. Perdue — 加拿大汉密尔顿 McMaster 大学小肠疾病研究组 (Intestinal Disease Research Programme, McMaster University, Hamilton, Ontario, Canada)

Dieter Reissig — 德国莱比锡大学医学院解剖学研究所 (Institute of Anatomy, Medical Faculty, University of Leipzig, Leipzig, Germany)

Godfried M. Roomans — 瑞典乌普萨拉大学医学细胞生物学系 (Department of Medical Cell Biology, Uppsala University, Uppsala, Sweden)

Carsten Röpke — 丹麦哥本哈根 Panum 学院医学解剖学系 (Institute of Medical Anatomy, The Panum Institute, Copenhagen, Denmark)

Joachim Rychly — 德国罗斯托克大学内科系 (Department of Internal Medicine, University of Rostock, Rostock, Germany)

Carin Sahlberg — 芬兰赫尔辛基大学牙科研究所 (Institute of Dentistry, University of Helsinki, Helsinki, Finland)

Hidetaka Sasaki — 日本仙台 Tohoku 医学院老年与呼吸医学系 (Department of Geriatric and Respiratory Medicine, Tohoku University School of Medicine, Sendai, Japan)

Jie Shen — 美国加利福尼亚州欧文 Allergan 公司药代动力学与药物代谢 (Pharmacokinetics and Drug Metabolism, Allergan, Inc., Irvine, CA)

Philip M. Sherman — 加拿大多伦多大学患病儿童医院胃肠病科 (Division of Gastroenterology, Hospital for Sick Children, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada)

Wee Soo Shin — 日本东京大学健康服务中心 (Health Service Center, University of Tokyo, Tokyo, Japan)

Alphonse E. Sirica — 美国弗吉尼亚联邦大学弗吉尼亚校医学院细胞和分子病原学科病理学系 (Department of Pathology, Division of Cellular and Molecular Pathogenesis, Medical College of Virginia Campus, Virginia Commonwealth University, Richmond, VA)

George Stoica — 美国得克萨斯工学院兽病原生物学系 (Department of

Veterinary Pathobiology, Texas A&M University, College Station, TX)

Charles H. Streuli 英国曼彻斯特大学生物科学院 (School of Biological Sciences, University of Manchester, Manchester, UK)

Yukio Sumi 日本名古屋 Daini 红十字医院牙科和口腔与颌面骨外科 (Department of Dentistry and Oral & Maxillofacial Surgery, Nagoya Daini Red Cross Hospital, Nagoya City, Japan)

Tomoko Suzuki 日本仙台 Tohoku 医学院老年与呼吸医学系 (Department of Geriatric and Respiratory Medicine, Tohoku University School of Medicine, Sendai, Japan)

Jan Taipalensuu 瑞典乌普萨拉大学制药学部 (Division of Pharmaceutics, Uppsala University, Uppsala, Sweden)

Staffan Tavelin 瑞典乌普萨拉大学制药学部 (Division of Pharmaceutics, Uppsala University, Uppsala, Sweden)

Irma Thesleff 芬兰赫尔辛基大学生物技术研究所 (Institute of Biotechnology, University of Helsinki, Helsinki, Finland)

Teruhiko Toyo-oka 日本东京大学医学院健康服务中心器官病理生理系与内科系 (Department of Organ Pathophysiology and Internal Medicine, Health Service Center, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, Japan)

Minoru Ueda 日本名古屋大学医学院口腔与颌面骨外科系 (Department Oral & Maxillofacial Surgery, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya City, Japan)

S. Pary Weber 美国艾奥瓦州大学医学院内科系 Howard Hughes 医学所 (Howard Hughes Medical Institute, Department of Internal Medicine, University of Iowa College of Medicine, Iowa City, IA)

Michael J. Welsh 美国艾奥瓦州大学医学院内科系 Howard Hughes 医学所 (Howard Hughes Medical Institute, Department of Internal Medicine, University of Iowa College of Medicine, Iowa City, IA)

Norihiro Yamada 日本仙台 Tohoku 医学院老年与呼吸医学系 (Department of Geriatric and Respiratory Medicine, Tohoku University School of Medicine, Sendai, Japan)

Mutsuo Yamaya 日本仙台 Tohoku 医学院老年与呼吸医学系 (Department of Geriatric and Respiratory Medicine, Tohoku University School of Medicine, Sendai, Japan)

Joseph Zabner 美国艾奥瓦州大学医学院内科系 (Department of Internal Medicine, University of Iowa College of Medicine, Iowa City, IA)

Sebastian Zellmer 德国莱比锡大学医学院生物化学研究所 (Institute of Biochemistry, Medical Faculty, University of Leipzig, Leipzig,

Germany)

Qiuqu Zhao　美国纽约哥伦比亚大学公共健康学院环境健康科学系 (Division of Environmental Health Sciences, School of Public Health, Columbia University, New York, NY)

Wei Zheng　美国纽约哥伦比亚大学公共健康学院环境健康科学系 (Division of Environmental Health Sciences, School of Public Health, Columbia University, New York, NY)

参加翻译、校对人员

（排名不分先后）

段恩奎　刘为敏　曹宇静　王　莉　铁国栋　刘泽隆
李素敏　张　键　王希朝　戴博杰　黄文耿　任培根
周家喜　沈　政　李　晶　杨勇军　范秀军　贾莉玮
赵田夫　胡　增　彭　莎　赵　平

译 者 序

2002 年 11 月初，美国 Kansas 市仍然没有冬天的寒意，在对 Stowers Institute for Medical Research 访问之余，我和祝诚先生仍然没有忘记到书店转转。当时我们研究组正在从事胎儿表皮干细胞的分离与鉴定工作，遇到的第一个难题就是如何提高上皮细胞培养效率。

在 Kansas 市的书店里，看到 Clare Wise 主编、Humana Press 刚刚出版的分子生物学方法之第 188 卷《上皮细胞培养指南》(*Epithelial Cell Culture Protocols, Methods in Molecular Biology* Series, Volume 188)，我兴奋不已、如获至宝。这本由来自美国、英国、德国、加拿大、瑞典、芬兰、丹麦、日本等 58 位科学家共同完成的著作，系统地介绍了晶状体、导气管、胃黏膜、胸腺、胆管、肝脏、肺脏、前列腺、乳腺上皮和血管内皮细胞的培养方法及步骤，同时还介绍了许多重要的细胞和组织共培养模型及其应用，读来令人耳目一新，使我立刻产生了购买此书的念头。

回国后，此书也同样引起了同事和学生们的浓厚兴趣，由于国内尚未发现这类专著，大家一致希望将其翻译出来，供从事相关科研和教学的科技工作者和学生学习借鉴。由于需求导向，我的同事和学生参与的积极性很高，也吸引了组外甚至动物研究所外一些研究生加盟翻译，仅一个寒假就分头完成了第一稿。开学后此稿用于研究生自学课程，大家就翻译的 31 章内容轮流进行了交流，也为统一专业术语和翻译体例奠定了基础。随后将此书的背景向科学出版社李锋主任进行了介绍，得到了他的鼓励和支持，遂建议由科学出版社负责购买中译本版权，并予以出版。我们三修其稿，最终由王建辰教授仔细审查把关，才使本书有机会与读者见面。

在本译著出版之际，特向所有参与翻译和审订的专家、学者和研究生表示感谢，感谢他们一丝不苟的精神和为此付出的辛劳，同时，也向科学出版社表示感谢！

由于书中涉及不少生物学、医学以外的专业术语，加之译者专业知识和翻译水平所限，译著中错误之处在所难免，恳请读者朋友批评指正。

段恩奎

2005 年 8 月 22 日于北京

前　言

近十年来，关于上皮细胞分离和培养的研究取得了重大进展，涌现出许多新技术。单层上皮细胞培养可用于评价细胞的特性和行为，而模型系统中上皮细胞的应用，使我们能够更深入地理解细胞和分子机制及其相互作用。我们将常规方法和专业方法同时编入本书，借此为多种上皮细胞培养技术提供全面的、循序渐进的指导。《上皮细胞培养指南》不仅针对初次接触该领域、学习常规培养技术的人，而且对那些需要更全面、更专业方法的研究人员也会有帮助。本书不仅对上皮细胞培养具有重要的参考价值，而且是《分子生物学方法》系列丛书中其他细胞培养相关书籍的补充。

《上皮细胞培养指南》涉及的大量研究方法主要针对研究人员，但也有少部分是针对临床医生的。其内容包括不同组织和不同种属的原代细胞的建立和维持。本书重点强调了对上皮细胞进行深入分析和检测的方法，例如，对细胞凋亡和整联蛋白的分析，以及对膜电容和细胞生长融合的检测。应用不同的共培养技术，还可能开发出不同的体外研究系统。本书的一些章节涉及了这一内容，例如，血-脑屏障模型，研究上皮细胞与细菌相互作用的系统，以及药物吸收模型。从临床应用角度上来说，在上皮细胞培养方面最令人振奋的进展之一是将这些细胞应用于烧伤以及其他皮肤疾病的治疗上，本书对此也有所涉及。

在此，感谢在《上皮细胞培养指南》编写过程中给予帮助的人们，尤其是参与编写工作的所有作者，感谢他们将自己的工作和经验拿出来分享，也感谢他们对我的大力支持。感谢 John Walker 先生的帮助，他在我最需要帮助的时候给予迅速回复，感谢他在最初邀请我编写本书时给予的信任。感谢 NIMR 为我提供了编写资料，感谢 Robin Lovell-Badge 先生的鼓励和支持。最后，感谢 Juan Pedro Martinez-Barbera 先生的建议及其在我枯坐编写时给予的耐心。

克莱尔·怀斯(Clare Wise)

(杨勇军 译)

目　　录

第1章 人晶状体上皮细胞的培养

1

Nobuhiro Ibaraki

1 引言

晶状体由上皮细胞、纤维细胞和囊构成。纤维细胞和囊起源于晶状体上皮细胞；上皮细胞分化为纤维细胞并产生胶原，胶原是囊的主要成分。晶状体上皮细胞可以维持晶状体正常的生理状态和动态平衡，因此人晶状体上皮(human lens epithelial, HLE)细胞的培养可以为晶状体上皮在正常状态及白内障形成时的作用提供重要信息。

HLE 细胞难以培养的原因在于其来源有限、生存能力低和细胞脆弱。机械损伤、污染、试剂的毒性以及冻存等都很容易使 HLE 细胞受损，从而导致培养失败。

本章描述了培养 HLE 细胞的步骤，目的是使不熟悉这种培养的研究人员可以通过本章的介绍能够顺利操作。对于 HLE 细胞的来源、外植体培养、收获、传代、保存和运输方法也在本章中进行了阐释，对培养的重点则在注意事项中进行了说明。

2 材料

(1) DMEM 培养基。

(2) 胎牛血清(FBS)，质量要求见注意事项(2)。

(3) 庆大霉素溶液。

(4) 生长培养液：DMEM 添加 FBS 作为标准培养液。因为 HLE 细胞的生存能力低[见注意事项(3)]，除了细胞系以外，抗生素和抗真菌药品都不能用于 HLE 细胞的培养。10μg/mL 庆大霉素溶液可以用于 HLE 细胞系的培养。血清的浓度至少为 5%，HLE 细胞生长最好的情况出现在培养液中 FBS 达到了 20%时[1]。培养液在 4℃储存。

2

(5) 细胞消化液：0.05% 胰酶，0.02% EDTA。

(6) 无 Ca^{2+}、Mg^{2+}的 PBS 缓冲液。

(7) 二甲基亚砜(DMSO)。

(8) 直径 35mm、60mm、100mm 和 150mm 组织培养级的有盖培养皿(所有组织培养塑料器皿均购自 Falcon 公司)。

(9) $25cm^2$ 和 $75cm^2$ 组织培养级的培养瓶。

(10) 6、12 和 24 孔组织培养板。

(11) 冻存设备：Mr. Frosty(Nalgene)。

(12) 1.2mL 冻存管。

(13) 0.2μm 微孔滤膜。

(14) 培养箱[见注意事项(1)]。

(15) HLE 细胞。有 5 种获得人晶状体上皮细胞的可能途径。由于大多数国家不允许

利用胎儿组织，所以可以选用其他 4 种途径。

a. 从婴儿获得 HLE 细胞。婴儿的 HLE 细胞可以从患有早熟视网膜病或者先天白内障的患者获得。HLE 细胞黏附在晶状体前囊的一个小部分，这部分可以在晶状体剖开术过程中获得。然而，这种情况不经常发生，所以从婴儿获得 HLE 细胞是非常困难的[2]。

b. 从眼库获得 HLE 细胞。如果眼库是用于研究的(一些国家只允许利用眼库进行角膜成型术研究)，获得 HLE 细胞是非常容易的。切开悬韧带取出晶状体，在含有 5μg/mL 庆大霉素的 DMEM 中洗一次，然后浸入生长液内。去掉晶状体较后的部分，移去晶状体的皮质和核部分。HLE 细胞黏附在前囊的大副翼部分，可以用于外植体培养。

c. 从老年白内障患者获得 HLE 细胞。在对年老的白内障患者手术过程中，可以获得带有 HLE 细胞的前囊的中央部分。前囊的副翼可以用于外植体培养(通常从 60 岁以上患者获得的 HLE 细胞，从前囊上消化下来后不能够增殖)[3]。

d. HLE 细胞系。有两种细胞系：B3 细胞是一种转染入含有源自猿病毒 40(SV40)的腺病毒 12 永生化基因的永生化细胞[4]；另一个细胞系，SRA01/04，转染入含有一个 SV40(SV40)T 抗原(永生化基因)的质粒从而获得永生化[5]。两种细胞系都具有人源的正常上皮细胞形态学特征以及晶状体上皮细胞特异蛋白(α-或β-水晶蛋白)的正常表达。这些细胞系具有高增殖潜能，因此大部分细胞很容易得到，并且能够做一些广泛的晶状体研究。当 HLE 细胞系不能从商业途径得到时，它们可以由任意一个研究者提供。

3 方法

3.1 外植体培养

(1) HLE 细胞的培养。如果黏附在晶状体前囊的 HLE 细胞被消化下来，细胞就不会很好地黏附在培养器皿中，因为细胞数量很低，每个大前囊副翼大约有 1×10^5 个细胞，所以细胞浓度不会达到细胞生存所需要的水平。

(2) 将带有 HLE 细胞的前囊副翼放在直径 60mm 的有盖培养皿中，加入生长液刚好浸过副翼[见注意事项(7)]。

(3) 将培养皿放入培养箱中，1d 后，增加生长液的体积到 1mL，继续培养 2~3d。在此期间，不需要更换培养液[见注意事项(4)]。

(4) 培养 2~3d 后，可看到 HLE 细胞在前囊周围扩展。

(5) 为了从前囊副翼获得最大量细胞，需要按以下步骤进行[见注意事项(5)]。

(6) 弃掉生长培养液。

(7) 用 PBS 清洗一次。

(8) 向培养皿中加入 0.5mL 胰酶-EDTA 消化液[见注意事项(6)]。

(9) 在培养箱中孵育 5min，轻轻摇晃培养皿，将细胞从培养皿中消化下来。

(10) 不撤走胰酶-EDTA 溶液，加入生长液，再将培养皿放入培养箱内[见注意事项(7)]。

(11) 每 2 天更换一次培养液，培养 4d 后，从婴儿获得或从眼库年轻捐献者获得的 HLE 细胞增殖，并铺满培养皿的表面。

3.2 收集细胞

(1) 一旦外植体培养中细胞长满培养皿，下一步就收集细胞，将其用于传代，或冻存。弃掉生长培养液。

(2) 用 1mL PBS 洗细胞一次。

(3) 在 37℃用 1mL 胰酶-EDTA 溶液孵育 5min，几乎所有的细胞都可以从培养皿中消化下来。

(4) 上下轻轻吹吸 3~5 次。

(5) 把这些细胞转移入离心管。

(6) 加入 3mL 生长液终止消化。

(7) 上下轻轻吹吸 2~3 次。

(8) 用血细胞计数器计数，用生长培养液将细胞稀释到适当的浓度，并以台盼蓝排除法决定细胞数量，这些细胞可以用于传代或冻存。

3.3 细胞传代

4

7000±500 个/cm^2 HLE 细胞应该用于最初接种[见注意事项(8)]。

(1) 将收集的细胞在 1000*g* 离心 5min。

(2) 弃去上清液，将细胞用培养液重新悬浮。

(3) 接种细胞并放入培养箱中培养[见注意事项(7)]。

(4) 每 2 天更换一次培养液。

(5) 当细胞长满时，重复收集细胞和传代。

3.4 细胞冻存

适宜冻存的细胞数量是 1×10^6 个/mL[见注意事项(9)]。

(1) 1000*g* 离心收集的细胞悬液 5min。

(2) 弃去上清液，将细胞重新悬浮于 1mL 含有 5% DMSO 的 FBS 中。

(3) 将细胞移入一个冻存管中，放入冻存器(Mr. Frosty)中。

(4) −70℃冻存 8h。当冻存容器放在冰箱时，冻存容器的温度会自动以 1℃/min 的速度下降。

(5) 迅速将冻存管移入液氮(−196℃)中储存。

(6) 当解冻细胞时，迅速将冻存管放入 37℃水浴中，以免细胞因为产生冰晶而受损。

3.5 细胞运输

冻存管和单层细胞培养物是可以运输的。装有细胞培养物的冻存管可以在装有干冰的包裹中进行运输，然而需要特殊处理。运输之后，在解冻之前必须放在新鲜的干冰中或液氮中。如果储存在−4℃或−20℃冰箱中，细胞会受损。单层细胞培养物的运输步骤如下：

(1) 将 HLE 细胞传入 25cm^2 带密封盖的培养瓶中进行培养。

(2) 当细胞汇合时，弃去培养液，装入满瓶的培养液。

(3) 拧紧瓶盖，在室温条件下邮寄。

(4) 货到后，将培养瓶放入培养箱内过夜，以确保在运输过程中因摇晃等原因造成脱落和损伤的细胞得到恢复。

(5) 第 2 天打开培养瓶盖子，更换培养液，或收集细胞并传代。

4 注意事项

(1) 一个 CO_2 培养箱用于 HLE 细胞培养。培养条件是 37℃、含有 5% CO_2 和 100% 湿度。因为培养液中通常没有加入抗生素和抗真菌药品，如果没有很好保持培养箱内环境，培养物就很容易被污染。为避免污染，HLE 细胞的培养应使用专用的培养箱，并且每个月清洁一次，消毒托盘、格架，用乙醇擦拭内部，换水。

(2) 细胞黏附和增殖依赖于血清条件。购买血清前应做批次检测。如果被检血清好，从婴儿或者眼库中年轻的捐献者(40 岁以下)获得的 HLE 细胞，80%的初次培养细胞或第二次传代细胞都应该在培养 3h 后黏附于培养皿中。FBS 也是污染的可能来源之一，在被加入 DMEM 前需要过滤。

(3) HLE 细胞增殖潜能低，非常脆弱。通常培养 HLE 细胞时不加入抗生素和抗真菌药品，因为它们会损伤细胞。要保持工作区域的清洁，并且要求操作者具有良好的无菌技术。

(4) 在培养的最初几天，尤其是外植体培养的第一天，要避免频繁观察细胞。如果移动培养瓶，前囊副翼很容易从培养皿上脱落，一旦前囊副翼脱落了，HLE 细胞就不能在培养皿上黏附和扩展。

(5) 一旦 HLE 细胞能够在培养皿中扩展，它就具有黏附和增殖能力。在外植体培养过程中，细胞的分裂减缓了前囊副翼周围细胞之间的接触抑制，有助于获得大量的 HLE 细胞。

(6) 不要将 HLE 细胞在胰酶-EDTA 中消化时间太长，因为细胞消化液对细胞也有伤害。

(7) 接种 HLE 细胞后的最初 3h 内不要移动培养皿，细胞会在这 3h 的孵育中黏附在培养皿表面。

(8) HLE 细胞的增殖潜能取决于供体的年龄。一般来说，取自 60 岁左右老年白内障患者的 HLE 细胞，可以与前囊副翼(外植体培养)一起培养，不能传代；取自 20~50 岁供体的 HLE 细胞，只能传代一次；来自 20 岁以下的，可以传代 2 次。尽管取自婴儿的 HLE 细胞可以传代数次，但是它们的增殖潜能有限，长时间培养可以看到巨细胞的出现和细胞再生(cell regeneration)现象。

(9) 在冷冻和保存过程中，HLE 细胞的损伤源于冰晶形成的机械损伤、脱水、pH 变化、蛋白质变性和其他因素。可以通过以下方法来减少致命的作用：① 加入 DMSO，可以降低冰点；②缓慢冷却，让水在冷冻之前从细胞里渗出；③ 在液氮(−196℃)中冻存，可以抑制冰晶的生成；④ 在复苏时迅速升温，冰冻的细胞可以迅速度过−50~0℃这个时期，细胞损伤经常在这个时期发生。

(张　键 译　王希朝　段恩奎 校)

参 考 文 献

[1] Reddy, V. N., Lin, L. R., Giblin, F. J., Lou, M., Kador, P., and Kinoshita, J. H. (1992) The efficacy of aldose reductase inhibitors on polyol accumulation in human lens and retinal pigment epithelium in tissue culture. *J. Ocul. Pharmacol.* **8**, 43-52.

[2] Reddy, V. N., Lin, L. R., Arita, T., Zigler, J. S., Jr., and Huang, Q. L. (1988) Crystallins and their synthesis in human lens epithelial cells in tissue culture. *Exp. Eye Res.* **47**, 465-478.

[3] Ibaraki, N., Ohara, K., and Shimizu, H. (1993) Explant culture of human lens epithelial cells from senile cataract patients. *Jpn. J. Ophthalmol.* **37**, 310-317.

[4] Andley, U. P., Rhim, J. S., Chylack, L. T., Jr., and Fleming, T. P. (1994) Propagation and immortalization of human lens epithelial cells in culture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **35**, 3094-3102.

[5] Ibaraki, N., Chen, S. C., Lin, L. R., Okamoto, H., Reddy, V. N., and Pipas, J. M. (1998) Human lens epithelial cell line. *Exp. Eye Res.* **67**, 577-585.

7

第2章　人导气管上皮细胞的培养

Mutsuo Yamaya, Masayoshi Hosoda, Tomoko Suzuki,
Norihiro Yamada, Hidetada Sasaki

1　引言

为了开展对各种肺部疾病，如癌症、胞囊纤维化以及支气管哮喘的研究，必须解决导气管上皮细胞的培养方法。然而，导气管上皮细胞的培养仍很困难。我们已经改善了这些细胞的培养条件，利用这些细胞可以更好地了解胞囊纤维化的机制[1~4]、病毒感染的特点[5~7]，以及增进对导气管炎症的知识。

为了改善培养条件，使人体气管上皮细胞能够保持运输铁离子的特性和原来组织的超微结构，我们建立了下面的步骤。简言之，人气管上皮细胞经蛋白酶过夜消化被分离下来[1,2,8,9]。分离的上皮细胞铺在 Vitrogen 凝胶包被的底部多孔的载体上，培养基内含有 Ultroser G 血清替代物(USG)。细胞生长在空气界面(即黏膜表面不加培养基)上。这些培

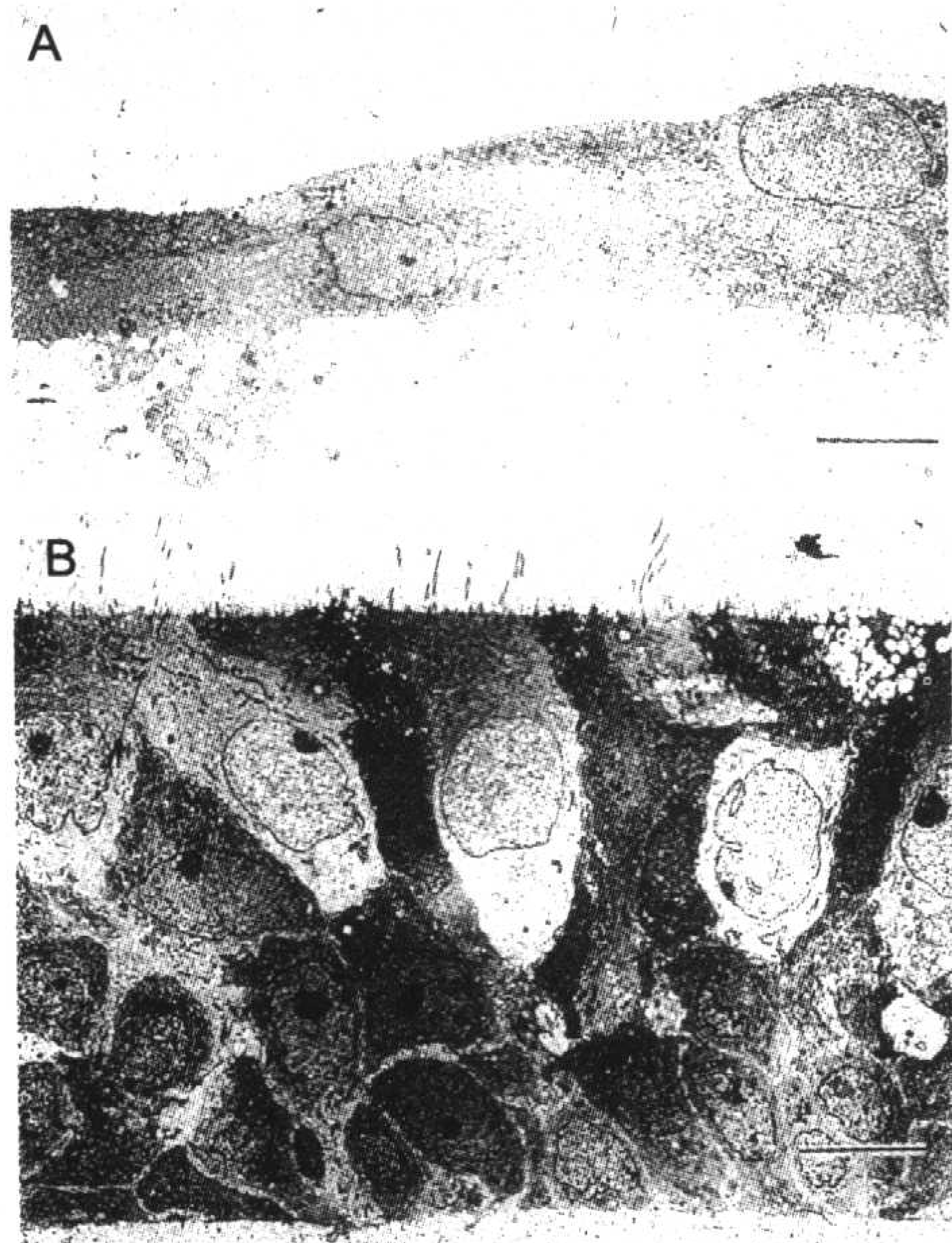


图 2.1　培养的人支气管上皮细胞的电镜图
(A) 人胎盘胶原，FCS-培养液， 浸入培养。(B) Vitrogen 凝胶，USG 培养液，空气界面培养。细胞呈多层，腔表面含有纤毛和分泌腺。标尺=10μm

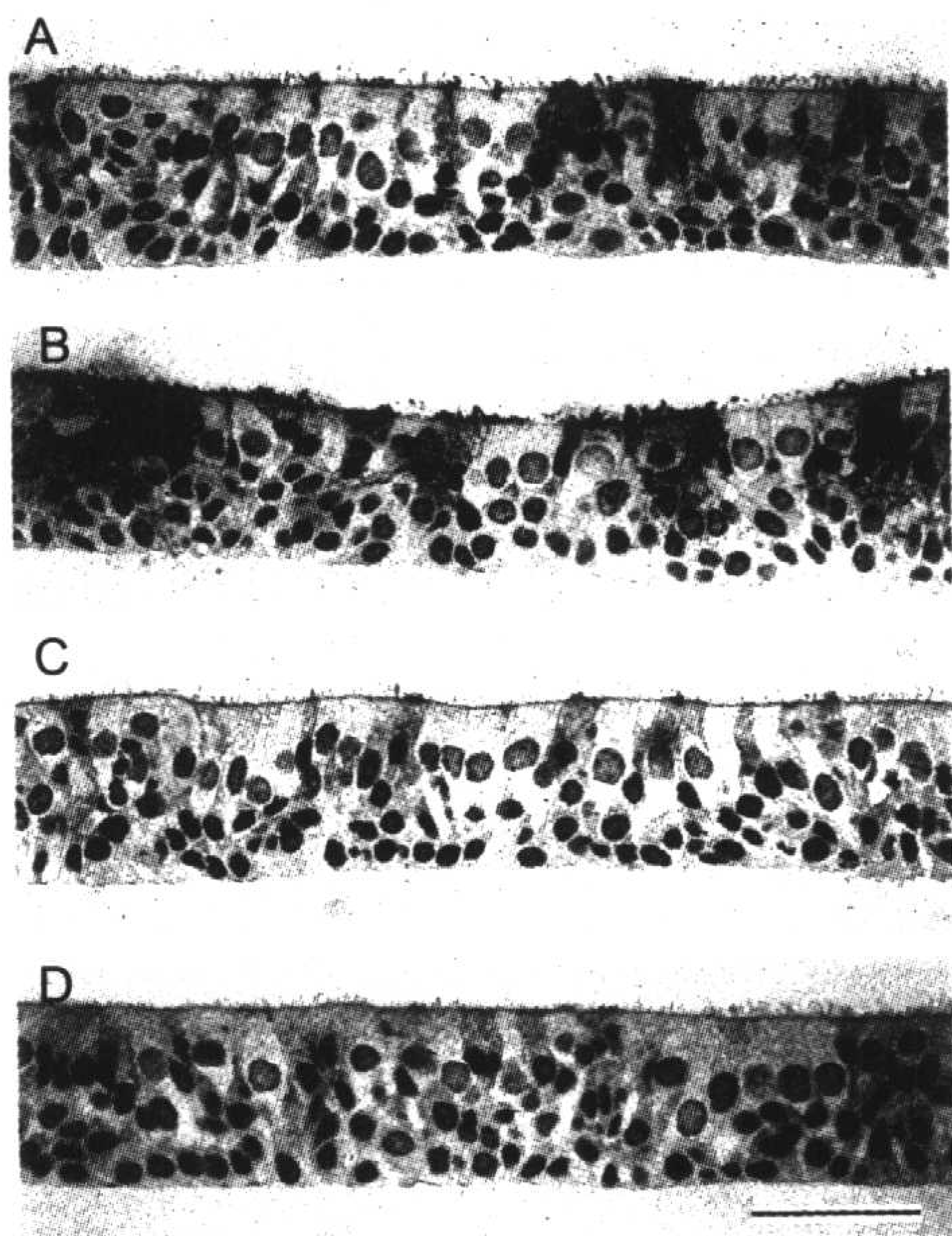


图 2.2　人支气管上皮细胞表达高杯细胞抗原
糖甲酰分泌物与单克隆抗体孵育并用抗生物蛋白-生物素-过氧化物酶染色。(A)抗体 A3G11 和(B)抗体 B6E8。二者均识别支气管高杯上皮细胞和黏液腺细胞抗原，并且着染整个培养的支气管上皮细胞。(C)抗体 A8E4。 这种抗体识别一种支气管黏液腺体细胞抗原,不着色。(D)抗体 B1D8。这种抗体识别一种支气管浆液腺细胞抗原,不着色。标尺=50μm

养条件(Vitrogen 凝胶、USG 添加物以及空气界面)可以导致纤毛出现、细胞层的厚度增加(50μm)、更长和更多顶端微绒毛出现、基部侧面膜指状突起间隙增加(图 2.1)。蛋白质和 DNA 的含量也显著增加。有抗体着色的分泌颗粒出现于高杯细胞，但是没有浆液腺或黏液腺体细胞(图 2.2)[1]。

用多种酶将人气管黏膜下层腺体的葡萄状腺消化分离下来[5~7,10]。分离到的葡萄状腺在人胎盘胶原包被的培养瓶中培养，培养液中加入 USG 以及各种生长因子。黏附的腺体在培养 14~21d 后铺满[5~7,10]。用胰酶消化细胞并重新接种在含有 USG 和各种生长因子的培养液中，培养在用人胎盘胶原包被的底部多孔的载体上[5~7]。在这种条件下培养的细胞具有高跨上皮细胞电阻和高短路电流。人气管上皮细胞和腺体细胞能够分泌氯离子，对血管舒缓激肽，α、β-肾上腺素和类胆碱试剂以及 ATP 做出反应。

人气管上皮细胞和黏膜下层腺体细胞可以在玻璃试管、盖玻片、载玻片、培养皿以及滤膜上生长。在这种条件下培养的细胞可以用来研究铁离子运输、细胞内钙离子浓度、上皮细胞通透性、上皮细胞损伤的修复、各种酶和蛋白质如细胞因子和细胞间黏附分子的产生[1~10]。

2 材料

2.1 培养器皿的包被

2.1.1 Vitrogen 凝胶

(1) MEM 培养基(GIBCO BRL Life Technologies)。

(2) 0.1mol/L NaOH。

(3) Vitrogen 溶液(胶原溶液)。

(4) Millicell-CM 或 Millicell-HM 嵌入物(insert)(Millipore): 孔径 0.45μm，面积 $0.6cm^2$。

2.1.2 胶原

(1) 人胎盘胶原(Sigma)。

(2) 双蒸水配制的 0.2%冰醋酸。

(3) 12 孔培养板 (Falcon)。

(4) CM 载体 (Millipore)：孔径 0.45μm，面积 $0.6cm^2$。

(5) Transwell 载体 (Corning Costar)：孔径 0.4μm。

(6) PBS(GIBCO BRL Life Technologies)补加 10^5U/L 青霉素、100mg/L 链霉素、50mg/L 庆大霉素以及 2.5mg/L 两性霉素 B(Sigma)。

2.2 人气管上皮细胞的培养

(1) 解剖工具。

(2) 解剖盘。

(3) PBS。

(4) 5mol/L 二硫苏糖醇(DTT)(Sigma)，溶解于 PBS 中。

(5) 蛋白酶溶液：0.4mg/mL XIV 型蛋白酶(Sigma)、10^5U/L 青霉素、100mg/L 链霉素、50mg/L 庆大霉素以及 2.5mg/L 两性霉素 B，溶解于 PBS 中。

取 50mL 的管，溶解 20mg 蛋白酶于 40mL 已经含有青霉素、链霉素和庆大霉素的 PBS 中。手摇，直到完全溶解，经 0.45μm 滤膜过滤除菌，然后加入两性霉素 B。

(6) 胎牛血清 (FCS)(GIBCO BRL Life Technologies)。

(7) F12-DMEM-FCS 混合液 I：DMEM 与 F12 1∶1 混合，然后添加 5% FCS。

(8) 0.4%台盼蓝 (Sigma)。

11

(9) Ultroser G 血清替代物(USG)培养基：1∶1 DMEM-Ham's F12 混合培养基(FD)中添加 2% USG、10^5U/L 青霉素、100mg/L 链霉素 50mg/L 庆大霉素以及 2.5mg/L 两性霉素 B。

按照生产厂家的说明溶解 USG 于蒸馏水中使其成为储液。混合 10mL 的 USG 于 480mL FD 混合培养基中，使 USG 的终浓度为 2%。培养基中应该添加抗生素[1]。

(10) Vitrogen 包被的 Millicell 载体。

(11) 胶原包被的 Transwell 载体。

(12) 载体(Millipore-CM)：孔径 0.45μm，面积 0.6 cm^2。

(13) 血球计。

(14) 50mL 锥形离心管(Corning Costar)。

(15) T_{25} 组织培养瓶(Corning Costar)。

(16) 圆底玻璃管，直径 15mm，长 105mm(Iwaki Glass)，用人胎盘胶原包被。包被试管时，加入 1mL 胶原储液,保持试管倾斜 5°，孵育至少 2h。移去胶原溶液，风干试管。

(17) 滚筒培养孵育器(HDR-6-T; Hirasawa, Tokyo, Japan)。

2.3 人气管黏膜下层腺体的培养

(1) PBS。

(2) 酶溶液：Hank 缓冲液(HBSS)(GIBCO BRL Life Technologies)添加 20mmol/L HEPES，pH7.4, 500U/mL IV 型胶原(Sigma)，6U/mL 猪胰腺蛋白酶(Sigma)，200U/mL 透明质酸酶(Sigma)，10U/mL 脱氧核糖核酸酶(Sigma)[5]。

(3) F12-DMEM-FCS 混合液 II：40% Ham's F12、40% DMEM、20% FCS。

(4) 生长培养液：1∶1 FD 添加 0.1%USG, 10μg/mL 胰岛素(Becton Dickinson)，5μg/mL 转铁蛋白(Becton Dickinson)，20ng/mL 三碘甲状腺氨酸(Becton Dickinson)，0.36μg/mL 水溶性氢化可的松 (Sigma)，7.5μg/mL 内皮细胞生长添加剂(Becton Dickinson)，25ng/mL 表皮生长因子(EGF)(Becton Dickinson)，0.1mol/L 视黄酸(Sigma)，20ng/mL 霍乱毒素(Sigma)，10^5U/L 青霉素，100mg/L 链霉素，50mg/L 庆大霉素，以及 2.5mg/L 两性霉素 B。

生长因子储液的配制：

a. 胰岛素：20mg 溶解在 4mL 蒸馏水中。

b. 转铁蛋白：10mg 溶解在 4mL 蒸馏水中。

c. 三碘甲状腺氨酸：20mg 溶解在 10mL 蒸馏水中。

d. 氢化可的松：10mg 溶解在 10mL 蒸馏水中。

e. 内皮细胞生长添加物：15mg 溶解在 4mL 蒸馏水中。

f. 表皮生长因子：100μg 溶解在 10mL 蒸馏水中。

12

g. 视黄酸： 溶解于 100%乙醇中成 1mmol/L。用蒸馏水稀释成 10μmol/L。

h. 霍乱毒素：0.5mg 溶解在 5mL 蒸馏水中。

制备生长培养液(500mL)：484mL 1∶1 FD 混合培养液(各 242mL)，1mL 胰岛素储液，1mL 蒸馏水含有 5μL 三碘甲状腺氨酸储液，1mL 蒸馏水含有 35μL 氢化可的松储液，1.25mL 表皮生长因子储液，5mL 10μmol/L 视黄酸。0.45μm 滤膜过滤除菌。然后加入 1mL 转铁蛋白储液、1mL 内皮细胞生长添加物储液、10^5U/L 青霉素、100mg/L 链霉素、50mg/L 庆大霉素，以及 2.5mg/L 两性霉素 B，再加入 0.5mL USG 储液。由于视黄酸对光敏感，生长培养液和视黄酸储液尽量在暗处配制。用锡箔包裹生长因子培养液，保存在 4℃。

(5) 0.25%胰酶-EDTA 消化液(Sigma)。

3 方法

3.1 培养器皿的包被

3.1.1 Vitrogen 凝胶

(1) 在 4℃下混合 10% 10×MEM、10% 0.1mol/L NaOH 和 80% Vitrogen 溶液(*V/V/V*)。

(2) 该溶液应呈黄色。

(3) 滴加 0.1mol/L NaOH 直到溶液变红。

(4) 按 0.15mL/cm^2 将此溶液加入到 Millicell 载体。

(5) 在 37℃孵育 1h。

(6) 在 2h 内使用。

3.1.2 胶原

(1) 溶解 50mg 胶原于 100mL 0.2%冰醋酸中制备人胎盘胶原储液，用磁力搅拌器混匀。

(2) 0.45μmol/L 过滤除菌。

(3) 将储液用双蒸水按 1∶5 稀释。按 20μg/cm^2 的胶原工作浓度加到培养器皿中。

(4) 用 2mL 工作液包被 35mm 培养皿或 6 孔培养板中的培养孔或者盖玻片。12 孔培养板则每孔用 1mL，Millicell 或 Transwell 载体则用 0.5mL，玻璃管则用 1mL 包被。

(5) 室温孵育至少 2h，最好在室温过夜。

(6) 弃去胶原溶液，风干。

(7) 用前以含有抗生素的 PBS 洗培养皿、培养板或载体，然后干燥。

3.2 人气管上皮细胞的培养

13

(1) 从前面纵切气管。

(2) 在解剖盘中，在上皮细胞丰富的地方展开气管。

(3) 在纵切面上评价上皮表面。

(4) 夹住这些黏膜带的一个末端，将整个黏膜下层拉下[1,11]。

(5) 用溶于 PBS 的 5mmol/L DTT 洗组织带 4 次。DTT 对于防止黏液滴的形成是非常重要的。

(6) 用 PBS 洗 2 次。

(7) 在 50mL 圆锥形离心管的 40mL 蛋白酶溶液中，4℃孵育过夜。

(8) 第 2 天，加 FCS 使其终浓度为 2.5%，终止蛋白酶的反应。

(9) 移去 20mL 溶液，加入等体积的 F12-DMEM-FCS 混合液 I。

(10) 用力摇动使细胞从上皮组织带上脱落。

(11) 弃去上皮组织条带。

(12) 用 10mL 吸管反复抽吸，分散剩余的细胞。

(13) 200*g* 离心沉淀细胞 10min。

(14) 在 F12-DMEM-FCS 混合液 I 中重悬细胞。

(15) 用血球计计数细胞，用台盼蓝检测其活力。核呈蓝色的为死细胞[1,11]。

3.2.1 准备细胞，以做进一步分析

(1) 为了检测上皮细胞的电特性或酶的产生，或跨上皮通透性，以 10^6 个/cm^2 接种到用 Vitrogen 凝胶包被的 Millicell-CM 或 Millicell-HA 载体上(见 3.1)[1,2]。

(2) 接种细胞 1d 后，用 USG 培养基更换培养液。

(3) 移走黏膜侧的液体，使细胞在空气界面上生长。

(4) 在 37℃、5%CO_2、95%空气的培养箱中培养。在前 7d 内，每天更换一次培养液；以后，每 2 天更换一次培养液。

(5) 大约在接种 5d 之后，上皮细胞铺满。这时细胞可以用于实验研究。

(6) 为了测定细胞内钙离子的浓度，人气管上皮细胞接种于胶原包被的膜上，然后按上述方法培养(见 3.2)[2]。

(7) 为了检测上皮细胞修复和增殖能力，以 10^6 个/cm^2 接种于 Millicell-CM 载体上，以 2×10^5 个/cm^2 接种细胞于 6 孔培养板中，按照上述方法培养[3]。

(8) 为了检测在 T_{25} 培养瓶中上皮细胞的修复，用吸管头触动这些上皮细胞以引发重要接触点的缺陷。

(9) 每天观察细胞的生长状态。

14

(10) 为检测细胞的增殖能力，将培养细胞在补加了[^{3}H]胸(腺嘧啶脱氧核)苷的培养液中培养 24h，然后检测放射性。

(11) 为了检测病毒感染对炎性细胞因子以及细胞内黏附分子产生的作用，将人气管上皮细胞以 2×10^5 个/cm^2 接种于包被有人胎盘胶原的圆形玻璃管中[8,9]。

(12) 用橡胶塞密封玻璃管，倾斜 5°，37℃培养。

(13) 当上皮细胞铺满，用鼻病毒感染细胞，在 33℃滚筒培养箱内培养。

3.3 人气管黏膜下层腺细胞的培养

(1) 在纵切条带上评价气管表面上皮，拉下黏膜下层。

(2) 从软骨和动脉外膜把富有黏膜下层腺体的组织解剖下来。

(3) 把组织浸在新鲜的 PBS 中。

(4) 在 PBS 中洗 4 次。

(5) 剪刀剪碎。

(6) 200*g* 离心组织碎片 10min。

(7) 在酶溶液中重新悬浮组织碎片[5,6,10]。

(8) 将溶液放入培养瓶中，放在摇床上 240 r/min 摇动，在室温下分散 12~16h。

(9) 轻轻倒出液体，液体内含有分散的组织。

(10) 200*g* 离心 10min。

(11) 在 F12-DMEM-FCS 混合液 II 中洗 1 次。

(12) 用 PBS 洗 2 次。

(13) 用 FD 混合培养液 II 重悬组织。

(14) 将葡萄状腺接种于 T_{25} 培养瓶中，37℃孵育 24h，5%CO_2、95%空气，黏附的和未黏附的葡萄状腺均如此。

(15) 消化过的培养板中剩余的黏膜下层组织碎片按照上述方法重新消化。

(16) 收集两次消化的细胞并且吹散。

(17) 混合两个 T_{25} 培养瓶中未黏附的葡萄状腺和分散的葡萄状腺。

(18) 200*g* 离心混合物 10min。

(19) 用 FD 混合液 II 重悬沉淀并且接种于含有黏附的葡萄状腺的 T_{25} 培养瓶中。

(20) 第 2 天早晨，用生长液更换培养液[5,7,10]。

(21) 细胞铺满需要 14~21d，细胞铺满后，用胰酶消化收集细胞。

(22) 胰酶消化时，用 PBS 洗 2 次，然后加 5mL 胰酶。

(23) 孵育 10~20min，直到所有细胞脱落。

(24) 200*g* 离心 10min，收集细胞。

(25) 用 FD 混合液 II 重悬沉淀。

(26) 血细胞计数器计数，用台盼蓝评估细胞活力。

15

3.3.1 为进一步分析进行细胞的准备

(1) 为检测人气管黏膜下层腺体细胞的电特性，以 10^6 个/cm^2 接种细胞于 Millicell CM 载体上，用 FD 混合液 II 培养。

(2) 24h 后，细胞在培养基内长满。

(3) 培养 7~9d 后可用于实验研究。

(4) 细胞应该在空气界面上生长，因此不要在黏膜表面加培养液。

(5) 检测人气管黏膜下层腺体细胞的钙离子浓度，接种细胞于胶原包被的 Transwell 膜上[2]，或者接种在包被有胶原的盖玻片上(见 3.1)[7]。

(6) 在检测钙离子浓度之前培养细胞 7~10d。

(7) 为了检测病毒感染对炎性细胞因子以及细胞内黏附分子产生的作用，人气管上皮细胞以 2×10^5 个/cm^2 接种于包被有人胎盘胶原的圆形玻璃管中[10]。

(8) 当细胞铺满之后，用鼻病毒感染细胞，在 33℃转动培养箱内培养。

致谢

感谢 Grant Crittenden 先生对英文稿的修改。

(张　键 译　王希朝　段恩奎 校)

参 考 文 献

[1] Yamaya, M., Finkbeiner, W. E., Chun, S. Y., and Widdicombe, J. H. (1992) Differentiated structure and function of cultures from human tracheal epithelium. *Am. J. Physiol.* **262**, L713-L724.

[2] Yamaya, M., Ohrui, T., Finkbeiner, W. E., and Widdicombe, J. H. (1993) Calcium-dependent chloride secretion across cultures of human tracheal surface epithelium and glands. *Am. J. Physiol.* **265**, L170-L177.

[3] Yamaya, M., Sekizawa, K., Masuda, T., Morikawa, M., Sawai, T., and Sasaki, H. (1995) Oxidants affect permeability and repair of the cultured human tracheal epithelium. *Am. J. Physiol.* **268**, L284-L293.

[4] Yamaya, M., Sekizawa, K., Yamauchi, K., Hoshi, H., Sawai, T., and Sasaki, H. (1995) Epithelial modulation of leukotriene-C4-induced human tracheal smooth muscle contraction. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **151**, 892-894.

[5] Yamaya, M., Finkbeiner, W. E., and Widdicombe, J. H. (1991) Ion transport by cultures of human tracheobronchial submucosal glands. *Am. J. Physiol.* **261**, L485-L490.

[6] Yamaya, M., Finkbeiner, W. E., and Widdicombe, J. H. (1991) Altered ion transport by tracheal glands in cystic fibrosis. *Am. J. Physiol.* **261**, L491-L494.

[7] Yamaya, M., Sekizawa, K., Kakuta, Y., Ohrui, T., Sawai, T., and Sasaki, H. (1996) P2u-purinoceptor regulation of chloride secretion in cultured human tracheal submucosal glands. *Am. J. Physiol.* **270**, L979-L984.

16

[8] Terajima, M., Yamaya, M., Sekizawa, K., et al. (1997) Rhinovirus infection of primary cultures of human tracheal epithelium: role of ICAM-1 and IL-1 β. *Am. J. Physiol.* **273**, L749-L759.

[9] Suzuki, T., Yamaya, M., Sekizawa, K., et al. (2000) Effects of dexamethasone on rhinovirus infection in cultured human tracheal epithelial cells. *Am. J. Physiol.* **278**, L560-L571.

[10] Yamaya, M., Sekizawa, K., Suzuki, T., et al. (1999) Infection of human respiratory submucosal glands with rhinovirus: effects on cytokine and ICAM-1 production. *Am. J. Physiol.* **277**, L362-L371.

[11] Widdicombe, J. H. (1988) Culture of tracheal epithelial cells, p. 291-302, in *Methods in bronchial mucology* (Braga P. C. and Allegra, L., eds.), Raven Press, New York.

第3章　大鼠胃黏膜上皮细胞的培养

17

Yoshitaka Konda　Tsutomu Chiba

1　引言

胃由多种细胞类型构成，包括平滑肌细胞、间质细胞、血管形成细胞、神经细胞、血液细胞、免疫细胞和胃腺体细胞。胃上皮细胞至少可以进一步分为 11 种不同的细胞类型，从高度分化的细胞到增殖活跃的低分化的细胞[1]。主细胞能够产生和分泌胃蛋白酶原，壁细胞具有分泌盐酸的特殊功能，颈细胞和表层黏液细胞是产生黏液的细胞。除此以外，还有几种内分泌细胞产生促胃液素(gastrin)、生长激素抑制素和组胺，这些细胞被认为是终末分化细胞。另外还有一些细胞的前体形式存在于胃底腺，如表层黏液细胞和壁细胞的前体。有趣而且重要的是，所有这些不同类型的细胞被认为起源于一种单一的“干细胞”。

在培养胃上皮细胞时，至少面临两个问题。

首先是细胞的“纯度”问题。正如上面所述，胃或胃底腺包括多种类型的细胞，因此，很难获得一个高纯化的、只含有单一细胞类型的培养。Soll 等首先解决了这个问题[2]。他们根据 Percoll 密度梯度原理，用一种逆流淘选的方法，根据细胞大小分馏细胞，从犬科动物基部黏膜分离细胞并且制成细胞悬液。用这种方法，我们在分离培养壁细胞、ECL 细胞、D 细胞、G 细胞和主细胞方面增长了很多知识。通过这种方法获得的细胞纯度足够做一定的实验，如酸的输出以及促胃液素或生长激素抑制素的分泌。然而，对于更精密的实验，如阐明细胞内信号转导，其他细胞类型对培养的污染是一个很关键的问题。Kinoshita 等基于这个方法成功的培养了原代表层黏液细胞[3]。幸运的是，在胃表层黏液细胞原代培养的过程中，与其他类型的胃底腺细胞相比，它们在培养皿中黏附和生长的速度相当快[4]。我们在此描述的方法充分利用了胃表层黏液细胞的这些特性。

18

其次是“分化”问题。当分离的胃细胞接种到培养板后，它们立即开始去分化并很快失去或减少了终末分化特性。尽管培养条件，如培养液中细胞的密度、培养液中的添加物、培养板的铺碟物等能够改变去分化趋势，但是仔细观察培养的细胞与体内模型进行比较是必不可少的。

这里，介绍两种大鼠胃上皮细胞原代培养以及两种源自非转化大鼠或小鼠胃腺体细胞系培养的方法。

1.1　新生大鼠胃上皮细胞原代培养

有许多培养胃上皮细胞的方法[5~7]，但是普遍采用 Terano 等建立的方法[8]。使用这种方法，90%以上培养的细胞具有上皮细胞的特性。尽管有人尝试用五肽促胃液素处理将成纤维细胞减少了 20%[7]，但是应用新生大鼠胃这种方法更为有效。然而，即使应用这种方法，在传代第 4 天仍可以看到成纤维细胞过度生长。但是可以通过胶原酶处理，

或者用含有 *D*-缬氨酸的 F12 培养基预防这种过度生长。有丝分裂的指标在第 2 天达到最大(2.0%)。

在来自新生大鼠的胃上皮细胞原代培养成功之后，许多人尝试过通过简单步骤从成年大鼠胃获得大量的细胞方法。从成年大鼠[9]、兔[10, 11]和豚鼠[12]获得胃上皮细胞的培养系统均已有过报道。一般来说，来自成年胃的上皮细胞培养所含的成纤维细胞比来自新生胃的要多。为预防污染大量的成纤维细胞，Matsuoka 等[10]将胃翻转，暴露其黏膜面，在胶原酶消化前刮下黏膜层，用蛋白酶 E 有效的消化表面上皮细胞[12]。

19

2 材料

2.1 新生大鼠胃上皮细胞原代培养

(1) 1~2 周龄 Sprague-Dawley 大鼠。

(2) 含 100U/mL 青霉素、100μg/mL 链霉素的 Hank 平衡盐溶液(HBSS)。

(3) 酶溶液：HBSS 添加 0.1%胶原酶和 0.05%透明质酸酶(Sigma)。

(4) 200 目尼龙筛(Nakarai Tesque, Japan)。

(5) 生长培养液：Coon 改良的 Ham's F12 培养液，添加 10% FBS、15mol/L HEPES、100U/mL 纤粘连蛋白、100U/mL 青霉素、100μg/mL 链霉素和 100μg/mL 庆大霉素。

(6) 戊巴比妥钠：5mg/mL 储液；用量为每克体重 10μL。

2.2 成年大鼠胃上皮细胞原代培养

(1) 8 周龄 Wistar 大鼠。

(2) 灌注溶液：无 Ca^{2+}、Mg^{2+}的 HBSS 缓冲液，添加 50mmol/L EDTA。

(3) 消化液：HBSS 缓冲液添加 0.75% IV 型胶原酶和 0.1%透明质酸酶。

3 方法

3.1 新生大鼠胃上皮细胞原代培养

(1) 注射戊巴比妥钠(5mg/mL 储液)麻醉大鼠每克体重 10μL。

(2) 割除大鼠的胃[见注意事项(1)]。

(3) 在室温下，放入含有青霉素和链霉素 HBSS 缓冲液的 10cm 塑料培养皿中。

(4) 用小剪刀切除胃基底部(此处通常被认为皱褶区域)。

(5) 将基底部切成条带。

(6) 用 HBSS 洗 3 次，然后剪成 2~3mm^3 碎片[见注意事项(2)]。

(7) 将碎片放入酶溶液。

(8) 37℃水浴孵育悬液 60min[见注意事项(3)]。

(9) 用吸管上下吹吸几次，完全吹散细胞。

(10) 再孵育 15min，然后用吸管再吹吸。

(11) 尼龙筛过滤。

(12) 1000*g* 离心含有细胞团块的滤液 15min。

(13) 按前面介绍的方法，用培养液清洗沉淀物并离心。

(14) 用培养液重悬沉淀物。

20

(15) 在 37℃、5% CO_2 条件下培养。当细胞在 I 型胶原铺碟的培养板中培养时，它们的生长状态比在未包被的培养板中要好。一般每 2 天更换一次培养液。传代时，用商品化的胰酶-EDTA 溶液。然而，与其他培养的细胞相比，这些细胞完全脱落需要更多的时间。在 4~5 代之后，大多数细胞失去它们的生长活性并且死亡。

3.2 成年大鼠胃上皮细胞原代培养

即便应用 3.1 中描述的方法，上皮细胞培养中成纤维细胞的污染仍然是个大问题[见注意事项(4)]。Ichinose 和他的同事应用以下的方法部分地解决了这个问题[13,14]，使获得的上皮细胞中尽可能少地掺杂成纤维细胞，因此，可以观察胃上皮细胞和间质细胞之间的关系。

他们还研究了基质(I 型胶原、IV 型胶原、纤粘连蛋白和层粘连蛋白)在上皮细胞黏附和增殖中的作用。据报道，在包被有这些基质，用添加了 0.1%犊牛血清和表皮生长因子(EGF)、霍乱毒素、氢化可的松和胰岛素的 Ham's F12 培养液培养时，这种方法获得的胃上皮细胞能够形成单层并且能够在培养板上增殖。不像用这种方法获得的肠道上皮细胞[15]，在胃上皮细胞的培养中对转铁蛋白无明显反应。

(1) 用戊巴比妥钠麻醉大鼠。

(2) 用剪刀在腹部由中向上至左上部剪开。

(3) 在右心房插入连有硅化管的针(16 或 18 号)。

(4) 从左心室切开 5mm。

(5) 用灌注泵将冰浴的灌注液以 5mL/min，或更慢的速度灌注大鼠，直到肝脏呈现苍白色。

(6) 灌注之后，很容易在解剖镜下分离胃上皮和间质。

(7) 向胃上皮加消化液。

(8) 在 37℃水浴中摇晃(100r/min)培养瓶中的上皮和消化液 15min(此时间依照实验而定)。

(9) 在摇晃的同时，在光学显微镜下观察少量胃上皮样品，直到消化完全。

(10) 离心，弃去消化液，在 I 型胶原铺碟的培养板上，用含 10% FBS 的 FD 培养液培养细胞。

21

3.3 源自大鼠胃的非转化上皮细胞系

尽管对方法做了改进，但胃黏膜细胞的原代培养仍很耗时，而且获得的细胞达不到 100%的纯度。大多数情况下，这些细胞不适合做 DNA 转染。而且，因为这些细胞一旦失去在组织中具有的生理三维关系就开始凋亡，它们基本上不适合用于检测凋亡事件的实验。

Matsui 已经建立了一种源自大鼠胃黏膜的细胞系(RGM1)[16][见注意事项(5)]。从麻醉的 4 周龄的 Wistar 大鼠获得胃，并使其翻转、里面朝外。在 4℃用 PBS 洗黏膜，翻转的胃在 37℃浸于 0.2%蛋白酶 E 的消化液中。消化液每 15min 更换一次，离心收集片状脱

落的胃细胞。之后，用 PBS 洗 2 次，培养于添加了 20%FBS(RGM1 可以于 10%FCS 中培养)的 FD 混合培养液中。当在传至第 10 代时，细胞系被称为 RGM1。

用 30~40 代的细胞检测 RGM1 的特性。RGM1 细胞是上皮细胞同源的细胞，具有大的椭圆核，细胞呈多角形。它们以 15.7h 倍增的时间和(1.97±0.38)×10^5 个/cm^2 的细胞饱和密度长成单层。当它们长成一片并呈多层时就会停止增殖或生长。RGM1 细胞在软琼脂上不能形成克隆及单一细胞。特别是，流式细胞仪显示 RGM1 DNA 是双倍体。这些特点是未转化细胞的特征。RGM1 细胞可以产生前列腺素、ICAM1、胰岛素样生长因子(IGF)-II、des-1-IGF-II、IGF 结合蛋白-2、SPARC 以及β2-巨球蛋白。

在过去的几年里，RGM1 一直被用做一种典型的非转化上皮细胞培养模型，并且报道了 RGM1 的确切特性。例如，Miyazaki 报道肝素结合 EGF 样生长因子是大鼠胃上皮细胞的一种自分泌生长因子[17]。Hassan 发现前列腺素(PG)E2 在黏蛋白合成过程中通过 PGEP4 受体，而不是 EP1 和 EP3 受体而发挥重要作用[18]。Jones 等研究了 COX-2 在 RGM1 细胞上表达，以及杂种生长因子(HGF)对 COX-2 表达的刺激作用[19]。Pai 报道 *Helicobacter* 幽门菌形成空泡的细胞毒素(VacA)在受损伤的胃上皮单层具有重新上皮化的作用[20]。

RGM1 在日本理化学研究所的细胞库内保存注册。日本理化学研究所的网址是 http://www.rtc.riken.go.jp，传真号为+81-298-36-9130。

22

3.4 源自小鼠胃的非转化上皮细胞系

尽管本章是关于大鼠胃上皮细胞的培养，我们还是想描述一下源自小鼠胃的 GSM06 非转化上皮细胞系[见注意事项(7)和(8)]。许多研究人员已经提示，转染了温度敏感猿病毒 40(stSV40)的大 T 抗原基因的永生化细胞或多或少地保持了起源细胞的稳定细胞特异功能的类型，并且原癌基因产物在非允许的温度下快速降解，但是在允许的温度下发挥其功能。Obinata 和她的研究组建立了转基因(一种 stSV40 大 T 抗原基因)小鼠，并且利用这些转基因小鼠的胃已经建立一种表面黏膜细胞系 GSM06[21,22]。

对 Schepp 介绍的大鼠方法进行了改进，分离转基因小鼠的胃基底黏膜细胞[23]。将分离到的细胞在添加了 2% FBS、1% ITES、10ng/mL EGF 和抗生素(100U/mL 青霉素、100μg/mL 链霉素和 25μg/mL 两性霉素 B)的 FD 混合培养液中悬浮，然后接种在胶原包被的塑料培养皿上，在 5%CO_2、饱和湿度、37℃条件下培养 24h。随后，这些细胞在相似条件下(除温度变为 33℃外)继续培养。当这些细胞用于实验时，它们在饱和湿度的环境下，在添加了 10% FBS、1% ITES、10ng/mL EGF 的 FD 混合培养液中培养。像 RGM1 一样，GSM06 形成成片的细胞单层，并且显示出非转化表层黏液细胞的特性[见注意事项(6)]。GSM06 细胞的生长环境是在 33℃(允许的温度)和 37℃(中间温度)，以 29h 的倍增时间、(2.76±0.19)×10^5 个/cm^2 的细胞饱和密度下实现的。相反，在非允许温度(39℃)，GSM06 细胞不生长，但是在低于 33℃时，细胞恢复生长。染色体分析显示，GSM06 细胞的染色体分布广泛($2n$=35~102)。相反，从正常鼠胃黏膜获得的原代细胞或转基因小鼠($2n$=40)的 GSM06 细胞分别具有 38~43 条或 38~42 条染色体。

通过改进培养条件，大量不同类型的表层黏液细胞可以用 GSM06 细胞刺激。当细胞培养成紧密的连成一片的单层时，或在 39℃时，GSM06 显示更多的分化特征。相反，

当它们在一个非成片的细胞密度时，或在 33℃时，GSM06 很少分化[24~26]。分化的变化是明显而可靠的，然而，与体内的终末分化表层黏液细胞相比，成片培养的或在 39℃培养的 GSM06 细胞的黏膜腺体数量很少。像原代培养的胃上皮细胞一样，GSM06 具有周期性酸 Schiff 反应(PAS)阳性腺体，能够合成和分泌糖蛋白。尽管原代细胞产生这种糖蛋白，但是原代细胞一般不产生像在体内胃黏膜表面所见到的糖蛋白层[8,10]。然而，GSM06 确实能够产生黏液层。

23

关于 GSM06 进一步的信息可以在日本探测研究实验室 III，Daiichi Pharmaceutical Co.Ltd.,16-13,Kitakasai 1-chome, Edogawa-ku,Tokyo134 获得。传真号为+81-3-5696-8334。

4 注意事项

(1) 在整个处理过程中，保持细胞处在低温度条件下至关重要。

(2) 不要让细胞干燥。甚至在剪碎过程时，要加入少量的培养液。

(3) 用酶处理细胞时，处理时间要尽可能的短。

(4) 注意不要污染成纤维细胞。细胞黏附于塑料培养板上需要 10min 以上。成纤维细胞黏附的时间相当快。因此细胞可以预接种，允许成纤维细胞黏附，然后移走上皮细胞重新接种。

(5) 原代培养的胃表层黏液细胞或胃表层黏液细胞系都不足以研究表层黏液细胞的生理功能。尽管它们来自正常或非转化的动物，一旦作为培养细胞开始生长，它们的大部分生理功能就不同于体内的表层黏液细胞的功能。

(6) 值得注意的是，表层黏液细胞的培养不仅仅包括其他类型上皮细胞，还有非上皮细胞，如成纤维细胞和血细胞，这些细胞的类型及比例随着实验的不同而不同。这对于敏感的实验非常重要，如 PCR。

(7) 胃上皮细胞向上迁移很快，并且在 3d 内结束生命[27]。另一方面，RGM1 细胞比大多数培养的胃癌细胞系有较强的抵制细胞凋亡刺激的能力。

(8) 需要强调的是，在活体的胃内，上皮细胞经常受来自间叶细胞的信号、细胞外基质和汇合细胞背景的影响，尽管没有任何一种上皮细胞可以在完全缺乏上述影响的生理条件下生存，但是应用培养的细胞所进行的实验可排除这些“干扰”(noise)。

(张　键 译　王希朝　段恩奎 校)

参 考 文 献

[1] Karam, S. M., Leblond, C. P. (1992) Identifying and counting epithelial cell types in the “corpus” of the mouse stomach. *Anat. Rec.* **232**, 231-246.

[2] Soll, A. H., Grossman, M. I. (1978) Cellular mechanisms in acid secretion. *Annu.Rev. Med.* **29**, 495-507.

[3] Kinoshita, Y., Hassan, S., Nakata, H. et al. (1995) Establishment of primary epithelial cell culture from elutriated rat gastric mucosal cells. *J. Gastroenterol.* **30**, 135-141.

[4] Chew, C. S. (1994) Parietal cell culture: new models and directions. *Annu. Rev.* Physiol. **56**, 445-461.

[5] Logsdon, C. D., Bisbee, C. A., Rutten, M. J. et al. (1982) Fetal rabbit gastric epithelial cells cultured on floating collagen gels. *In Vitro* **18**, 233-242.

24

[6] Mardh, S., Norberg, L., Ljungstrom, M. et al. (1984) Preparation of cells from pig gastric mucosa: isolation by isopycnic centrifugation on linear density gradients of Percoll. *Acta Physiol. Scand.* **122**, 607-613.

[7] Miller, L. R., Jacobson, E. D., and Johnson, L. R. (1973) Effect of pentagastrin on gastric mucosa cells grown in tissue culture. *Gastroenterology* **64**, 254-267.

[8] Terano, A., Ivey, K. J., Stachura, J. et al. (1982) Cell culture of rat gastric fundic mucosa. *Gastroenterology* **83**,1280-1291.

[9] Ota, S, Razandi, M., Sekhon, S. et al. (1988) Salicylate effects on a monolayer culture of gastric mucous cells from adult rats. *Gut* **29**, 1705-1714.

[10] Matsuoka, K., Tanaka, M., Mitsui, Y. et al. (1983) Cultured rabbit gastric epithelial cells producing prostaglandin I_2. *Gastroenterology* **84**, 498-505.

[11] Watanabe, S., Hirose, M., Wang, X. E. et al. (1994) Hepatocyte growth factor accelerates the wound repair of cultured gastric mucosal cells. *Biochem. Biophys.Res. Commun.* **199**, 1453-1460.

[12] Matsuda, K., Sakamoto, C., Konda, Y. et al. (1996) Effects of growth factors and gut hormones on proliferation of primary cultured gastric mucous cells of guinea pig. *J. Gastroenterol.* **31**, 498-504.

[13] Matsubara, Y., Ichinose, M., Tatematsu, M. et al. (1996) Stage specific elevated expression of the genes for hepatocyte growth factor, keratinocyte growth factor and their receptors during the morphogenesis and differentiation of rat stomach mucosa. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **222**, 669-677.

[14] Matsubara, Y., Ichinose, M., Yahagi, N. et al. (1998) Hepatocyte growth factor activator: a possible regulator of morphogenesis during the fetal development of rat gastrointestinal tract. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **253**, 477-484.

[15] Fukamachi, H., Ichinose, M., Tsukada, S. et al. (1995) Hepatocyte growth factor region specifically stimulates gastro-intestinal epithelial growth in primary culture. *Biochem Biosphys Res. Commun.* **205**, 1445-1451.

[16] Kobayashi, I., Kawano, S., Tsuji, S. et al. (1995) RGM1, a cell line derived from normal gastric mucosa of rat. *In Vitro Cell. Dev. Riol.* **32**, 259-261.

[17] Miyazaki, Y., Shinomura, Y., Higashiyama, S. et al. (1996) Heparin-binding EGF-like growth factor is an autocrine growth factor for rat gastric epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **223**, 36-41.

[18] Hassan, S., Kinoshita, Y., Min, D. et al. (1996) Presence of prostaglandin EP4 receptor gene expression in a rat gastric mucosal cell line. *Digestion* **57**, 196-200.

[19] Jones, M. K., Sasaki, E., Halter, F. et al. (1999) HGF triggers activation of the COX-2 gene in rat gastric epithelial cells: action mediated through the ERK2 signaling pathway. *FASEB J.* **13**, 2186-2194.

25 [20] Pai, R., Sasaiki, E., and Tarnawski, A. S. (2000) *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin (VacA) alters cytoskeleton-associated proteins and interferes with re-epithelialization of wounded gastric epithelial monolayers. *Cell Biol. Int.* **24**, 291-301.

[21] Sugiyama, N., Tabuchi, Y. Horiuchi, T. et al. (1993) Establishment of gastric surface mucous cell lines from transgenic mice harboring temperature-sensitive simian virus 40 large T -antigen gene. *Exp. Cell Res.* **209**, 382-387.

[22] Tabuchi, Y., Sugiyama, N., Horiuchi, T. et al. (1996) Biological characterization of gastric surface mucous cellline GSM06 from transgenic mice harboring temperature-sensitive simian virus 40 large T-antigen gene. *Digestion* **57**, 141-148.

[23] Schepp, W., Kath, D., Tatge, C. et al. (1989) Leukotrienes C4 and D4 potentiate acid production by isolated rat parietal cells. *Gastroenterology* **97**, 1420-1429.

[24] Konda, Y., Yokota, H., Kayo, T. et al. (1997) Proprotein-processing endoprotease furin controls the growth and differentiation of gastric surface mucous cells. *J. Clin. Invest.* **99**, 1842-1851.

[25] Tabuchi, Y., Sugiyama, N., Horiuchi, T. et al. (1997) Insulin stimulates production of glycoconjugate layers on the cell surface of gastric surface mucous cell line GSM06. *Digestion* **58**, 28-33.

[26] Dohi, T., Nakasuji, M. Nakanishi, K. et al. (1996) Biochemical bases in differentiation of a mouse cell line GSM06 to gastric surface cells. *Biochim. Biophys.Acta* **1289**, 71-78.

[27] Karam, S. M., Leoblond, C. P. (1993) Dynamics of epithelial cells in the corpus of the mouse stomach. II. Outward migration of pit cells. *Anat. Rec.* **236**, 280-296.

第 4 章　胸腺上皮细胞的培养

27

Carsten Röpke

1　引言

为了评估胸腺细胞，二维单层胸腺细胞的培养已经应用了 20 余年。这些细胞取自婴儿和多种实验动物的胸腺。人们之所以对培养这些上皮细胞普遍感兴趣，主要原因是已经证明了胸腺基质细胞的重要性，尤其是胸腺上皮细胞在 T 淋巴细胞前体的选择以及功能性成熟 T 淋巴细胞的分化方面的意义[1~4]。然而，依赖上皮细胞和间质细胞亚型正确空间组成的 T 淋巴细胞前体的分化则有助于研究鼠类胎儿器官培养或者再聚集培养[5,6]，与此同时，像此处描述的一样，胸腺上皮细胞二维单层培养对于上皮细胞的特性、形态、亚型、表面特性、分泌、抗原存在以及该上皮细胞与加入培养液中 T 淋巴细胞前体的直接接触和上皮细胞系的建立都是大有帮助的。培养二维胸腺上皮单层细胞的方法已经建立了很多。大多数方法都采用胎牛血清或人血清[7]。血清的加入具有很多优点[8,9]，尤其是可以促进成纤维细胞生长，尽管这种促进作用能被阻滞[10~15]。本章主要介绍无血清培养方法，无血清培养顾及细胞生长需要的精确性、细胞分泌到培养液中分子的离析，以及确定这些分子发挥的生物学活性的重要性。下面以新生小鼠上皮细胞的培养方法作为基本步骤，介绍经改进的小鼠上皮细胞和人上皮细胞的培养方法。

28

2　材料

2.1　新生小鼠胸腺上皮细胞的无血清培养

胸腺上皮细胞的原代培养在无成纤维细胞或巨噬细胞、无血清，但在培养液中添加了霍乱毒素(CT)、胰岛素(IN)、氢化可的松(HC)、表皮生长因子(EGF)的条件下获得。为了避免角化细胞，应用低钙的培养基，含有 0.021mg/mL Ca^{2+}，而 DMEM/F12 含有 0.155mg/mL Ca^{2+}。

胶原酶/DNA 酶处理后，胸腺片段直接接种于无血清但添加了生长因子的培养液中，培养瓶用玻连蛋白包被。2~3 周后，单层的上皮细胞从片段扩展出来。二次培养可通过消化培养物而获得。培养细胞的表型主要是髓质，标记为皮质的细胞所占的比例低于 20%，非上皮细胞的比例低于 5%。实质上，所有细胞均呈现 I 类抗原，而 II 类抗原是不定的，通常很弱[7,16]。

(1) 2~5d 龄小鼠。

(2) 乙醚。

(3) 软木板(Corkplate)。

(4) 70%乙醇。

(5) 大头针。

(6) 止血钳、剪刀和手术刀。

(7) 玻璃培养皿(7cm)。

(8) 塑料培养皿 (9cm)。

(9) 塑料试管(12mL)

(10) 2mL 和 10mL 吸管。

(11) 加样器和塑料滴头。

(12) 塑料培养瓶(25mL)。

(13) 室式塑料培养片(每片两室，NUNC)。

(14) 无 Ca^{2+}、Mg^{2+}的 PBS 缓冲液。

(15) DMEM/F12 1∶1 混合液。DMEM 无 Ca^{2+}。该混合培养液添加 2mmol/L 谷氨酰胺、250U/mL 青霉素、25μg/mL 链霉素，最长可在 4℃下保存 1 周。

(16) DNA 酶(Sigma)，15 000U 加入 10mL 蒸馏水中，灭菌，–20℃储存可达数月。

(17) 胶原酶 DNA 酶溶液：将 15mg IV 型胶原酶(176U/mg；Worthington)、10mg 胶原酶(Boehringer Mannheim)和 500μL DNA 酶溶液加入 10mL 培养液中，使用前过滤除菌。

29

(18) Vitrogen100(3mg/mL；Collagen Biomaterials)，4℃可储存 1 年。使用前用 PBS 按 1∶30 稀释。

(19) 胰酶-EDTA(1×)，–20℃储存 1 年。

(20) 使用前添加生长添加剂[见注意事项(1)和(2)]。

a. IN(NOVO)，100U/mL，用生理盐水按 1∶1 稀释，–20℃保存数月，4℃可储存 1 周。将 15μL IN 稀释液加到 10mL 培养液中，成为 0.075 IU 或 3μg/mL 的浓度。

b. CT(Sigma)，1 安瓿(0.5mg)稀释到 1mL 蒸馏水中，然后用蒸馏水按 1∶50 稀释。4℃可储存 1 周。取 10μL 加入 10mL 培养基中，使其终浓度为 10ng/mL。

c. EGF(Collaborative Research)，1 安瓿(100μg)溶解到 5mL 蒸馏水中，–20℃可储存较长时间，4℃可储存 1 周。取 10μL 加入 10mL 培养基中，使其终浓度为 20ng/mL。

d. HC(Collaborative Research)，50mg HC 加入 10mL 96%乙醇中，–20℃可储存较长时间。用 96%乙醇按 1∶10 进一步稀释，4℃可储存 1 周。取 10μL 加入 10mL 培养基中，使其终浓度为 0.5μg/mL[见注意事项(3)]。

(21) 1%大豆胰蛋白酶抑制剂。

2.2 胎鼠胸腺上皮细胞无血清培养

可以用来自小鼠胎儿(13~18d 胎龄)的胸腺叶进行原代胸腺上皮细胞培养。在上述的特定培养液中细胞易于生长，且比从幼鼠获得的胸腺上皮细胞生长得快。此外，这类细胞传代培养也比来自幼鼠的容易成功。取自幼鼠的细胞培养，大多数细胞属于髓质表型。

(1) 交配的妊娠小鼠(有阴栓的为 0d)。

(2) 立体解剖镜。

(3) 小剪刀。

(4) 尖头镊子。

(5) 2.5mL 试管。

其他材料与 2.1 的相同。

2.3 人胸腺上皮细胞的无血清培养

胶原酶/DNA 酶处理后，转移至特定的无血清培养基中，在 Vitrogen 包被的培养板中进行人胸腺组织产生初级胸腺上皮细胞的培养。根据迁移划分上皮细胞形成的细胞岛，在 1~3 周内能够铺满，形成 Hassall 体。细胞很容易传到 4~5 代,大多数细胞(80%以上)表现髓质表型，剩下的细胞表现皮质表型[17]。

30

(1) 从因为先天性心脏病而进行心血管手术的 1~2 岁儿童获得胸腺组织。

(2) 含有 PBS 的 50mL 旋盖试管。

其他见 2.1，但是本方法中的 DMEM/F12 混合培养液内含有正常的钙浓度。

3 方法

3.1 新生小鼠胸腺上皮细胞无血清培养

(1) 培养的前一天，用 1mL Vitrogen 溶液冲洗每个培养小室，或者用 4mL Vitrogen 溶液冲洗 25mL 培养瓶，置 4℃保存直到使用前[见注意事项(4)]。培养瓶/培养皿用 PBS 洗 2 次备用(PBS 处理后，培养瓶/培养皿可以在 4℃保存 1 个月)。

(2) 用乙醚处死一窝(通常 6~10 只)新生小鼠[见注意事项(5)]。

(3) 用 70%乙醇洗，用大头针将小鼠固定在铺纸的软木手术盘上。用剪刀从腹上部到喉部纵切皮肤，从左右腋下通过肋骨架剪开胸腔，用镊子将胸架前面提起。

(4) 定位胸腺的位置，轻轻地用镊子或灭菌棉签取出，尽可能地去除结缔组织和血管。

(5) 将胸腺组织放入盛有 5mL FD 混合液的玻璃皿中，去掉其他组织。

(6) 更换培养液。

(7) 用手术刀将所收集胸腺组织剪成 1~3mm^3 的小块。

(8) 用吸管将碎块转移到 12mL 试管中，斜向剪掉塑料吸管头部，以便碎块容易进出。

(9) 用 10mL 培养液清洗 2 次，每次 5min。

(10) 弃去培养液，加入 10mL 无菌的胶原酶/DNA 酶溶液。

(11) 将试管的内容物倒在塑料皿中，37℃孵育 90min。每 5~10min 用手轻轻地摇动一次。

(12) 处理后，再将这些碎块转移到 12mL 试管内，用 10mL 培养液清洗 2 次，每次 5min[见注意事项(6)]。

31

(13) 在进行到步骤(14)之前的 1h，加入生长因子 IN、CT、EGF 和 HC 到 FD 混合液中。

(14) 将胸腺碎块放入培养液中。每个培养室放入 5~6 块，加入 1mL 完全培养液。每个 25mL 培养瓶中放入 30~40 块组织，加入 5mL 完全培养液。

(15) 在 37℃下于饱和湿度的 5%CO_2/95%空气培养箱中培养。

(16) 每隔 2~3d 更换一次培养液。3d 之后移走没有黏附到培养皿的组织块。

(17) 用倒置显微镜观测生长状态。在培养 2~3d 后，可以看到上皮细胞在胸腺组织旁边扩展出来，形成岛状、单一的细胞晕。这些细胞晕在 2~3 周内伸展并连成一片。以

后，伸展停止，但是培养物仍然能够在随后的几周内生存。

(18) 在培养的第 2 周或第 3 周，细胞可以通过消化被转移到一个新的 Vitrogen 包被的培养皿中。

(19) 当弃去培养液以后，每个室加入 1mL 胰酶-EDTA 消化液，或者每个培养瓶加 5mL 胰酶-EDTA 消化液。

(20) 37℃下孵育 15~20min。此时，检查细胞是否脱落，如果没有，再孵育数分钟。

(21) 为停止消化，每毫升培养液中加入 200μL 1%大豆胰蛋白酶抑制剂。由胰蛋白酶抑制剂代替大豆胰蛋白酶抑制剂时不用含有血清的培养液[见注意事项(7)]。

(22) 把这些细胞吸入一个新管，然后加入培养液洗细胞。

(23) 弃去培养液，加入完全培养液，用吸管将细胞转移至新的培养室。

(24) 转移的理想的结果是将 10^5 个细胞转移至 1mL 培养室内，10^6 个细胞转移至一个 25mL 培养瓶中。如果收集的细胞量比较少，Vitrogen 包被的 Terasaki 培养板或 96 孔微滴度培养板是适合的(如果细胞用于功能性实验，培养基内有血清，5%血清用于洗培养基代替胰蛋白酶抑制剂)。

3.2 胎鼠胸腺上皮细胞的无血清培养

(1) 见 3.1 中的步骤(1)。

(2) 在乙醚麻醉下处死怀孕小鼠[见注意事项(5)]。

(3) 70%乙醇洗后，将小鼠固定在软木盘上，纵切腹部皮肤，将皮肤拉至一旁，从腹中线纵分开腹壁肌肉。

32

(4) 用镊子提起子宫角，用剪刀分离其他组织。

(5) 用剪刀剪下每个胎儿，放入盛有培养液的塑料皿中。

(6) 用剪刀纵切子宫角，从子宫腔中取出胎儿和胎盘并放入盛有培养液的塑料皿中。

(7) 用镊子从胎盘、胎膜和脐带中分离出胎儿。

(8) 转移胎儿入新的盛有培养液的塑料皿，置于倒置显微镜下。胎儿背部朝下，每条腿放于腋下。

(9) 纵向打开肋骨架，用另一把镊子轻轻取出胸腺组织(大约 0.5mm 大小)，胸腺正好在心脏的上方。

(10) 用吸管将胸腺组织放入盛有 1mL 培养液的 3.5cm 塑料皿中。

(11) 如果是妊娠 17~18d 小鼠的胎儿，用手术刀切下胸腺。取自胎儿的胸腺不要受到损伤。

(12) 弃去培养液，加入 1mL 胶原酶/DNA 酶溶液。

(13) 将培养皿放入 37℃、90min，每 5~10min 轻轻地摇晃几次。

(14) 处理之后，将胸腺转移到一个 2.5mL 试管内，用 2mL 培养液清洗 2 次，每次 5min。

(15) 在进行步骤(14)之前的 1h，将生长因子 IN、CT、EGF 和 HC 加入 FD 混合液中。

(16) 将胸腺碎块放入培养液中。每个培养室放 5~6 块组织，然后每室加入 1mL 完全培养液；每个培养瓶放大约 30~40 块，加入 5mL 完全培养液。

(17) 于 37℃放入饱和湿度的 5%CO_2/95%空气培养箱中培养。

(18) 每隔 2~3d 更换一次培养液。3d 之后移走没有黏附到培养皿的组织块。

(19) 用倒置显微镜观测生长状态。在培养 2~3d 后，上皮细胞可以在胸腺组织旁边伸展出来，形成岛状、单一的细胞晕。这些细胞晕在 2~3 周内伸展并连成一片。以后，伸展停止，但是培养物仍然能够在随后的几周内生存。

(20) 在培养的第 2 周或第 3 周，通过消化可以将细胞转移到一个新的 Vitrogen 包被的培养皿中。

(21) 弃去培养液,每个室加入 1mL 胰酶-EDTA 消化液,或者每个培养瓶加入 5mL 消化液。

(22) 37℃孵育 15~20min。此时，检查细胞是否脱落，如果没有，再孵育数分钟。

(23) 为停止消化，每毫升培养液中加入 200μL 1%大豆胰蛋白酶抑制剂。由胰蛋白酶抑制剂代替大豆胰蛋白酶抑制剂时不用含有血清的培养液[见注意事项(7)]。 33

(24) 用吸管将细胞转移至试管中，加入培养液，洗细胞。

(25) 弃去培养液，加入完全培养液，用吸管将细胞转移至新的培养室。

(26) 转移的理想结果是将 10^5 个细胞转移至 1mL 培养室内，10^6 个细胞转移至一个 25mL 培养瓶中。如果进行细胞收集，Vitrogen 包被的 Terasaki 培养板或 96 孔微型培养板是适合的(如果细胞不用于功能性实验，培养基内有血清，5%血清用于洗培养基代替胰蛋白酶抑制剂)。

3.3 人胸腺上皮细胞的无血清培养

(1) 见 3.1 的步骤(1)。

(2) 尽可能快地收集外科手术的组织，放入含有一些 PBS 的 50mL 试管中。在一些国家，要注意安全和伦理建议[见注意事项(5)和(8)]。

(3) 在无菌操作台上，将组织转移到一个玻璃皿中，用 PBS 洗几次。

(4) 选择几块合适的无结缔组织和血液的胸腺组织块，用手术刀切下来。

(5) 将这些碎块转移到另一个培养皿，剪成 1~2mm^3 的小块，用吸管将它们移入一个 12mL 试管。将塑料吸管头部斜向剪掉，让胸腺碎块容易出入。

(6) 用 10mL 培养液清洗 2 次。

(7) 弃去培养液，加入 10mL 无菌过滤的胶原酶/DNA 酶。

(8) 将内容物倒入一个塑料培养皿内，37℃孵育 90min。每隔 5~10min 轻轻摇晃一次。

(9) 处理后，再将这些碎块转移至一个 12mL 试管内，用 10mL 培养液清洗 2 次，每次 5min[见注意事项(6)]。

(10) 在进行步骤(11)之前的 1h，将生长因子 IN、CT、EGF 和 HC 加入 FD 混合培养液中。

(11) 将胸腺组织碎块放入培养液中。每个培养室放 5~6 块组织，然后每室加入 1mL 完全培养液。每个培养瓶放入 30~40 块，加入 5mL 完全培养液。

(12) 于 37℃在饱和湿度的 5%CO_2/95%空气培养箱中孵育。

(13) 每隔 2d 或 3d 更换培养液。3d 之后移走没有黏附到培养皿的组织块。

(14) 倒置显微镜观测生长状态。在培养 2~3d 后，上皮细胞可以在胸腺组织旁边伸展出来，形成岛状、单一的细胞晕。这些细胞晕在 2~3 周内伸展并连成一片。以后，伸 34

展停止，但是培养物仍然能够在随后的几周内生存。

(15) 在培养的第 2 周或第 3 周，经胰酶消化，细胞可以被转移到新的 Vitrogen 包被的培养室中。

(16) 弃去培养液以后，每个室加入 1mL 胰酶-EDTA 消化液，或者每个培养瓶加 5mL 胰酶-EDTA 消化液。

(17) 37℃孵育 15~20min。此时，检查细胞是否脱落，如果没有，再孵育数分钟。

(18) 为停止消化，每毫升培养液中加入 200μL 1%大豆胰蛋白酶抑制剂。由胰蛋白酶抑制剂代替大豆胰蛋白酶抑制剂时不用含有血清的培养液[见注意事项(7)]。

(19) 将这些细胞移入一个新管，加培养液，洗细胞。

(20) 去培养液，加入完全培养液，用吸管将细胞转移至新的培养室[见注意事项(9)]。

(21) 转移的理想结果是将 10^5 个细胞转移至 1mL 培养室内，10^6 个细胞转移至一个 25mL 培养瓶中。如果进行细胞收集，Vitrogen 包被的 Terasaki 培养板或 96 孔微滴度培养板是适合的(如果细胞不用于功能性实验，培养基内有血清，5%血清用于洗培养基代替胰蛋白酶抑制剂)。

4 注意事项

(1) 培养中需要高纯度的水。如果发现培养过程中细胞生长缓慢，应该制备新鲜的培养液。生长因子在 4℃放置不要超过一周。

(2) 起初培养液中加入转铁蛋白[加 20mg 转铁蛋白(在 4℃保存 1 年)于 10mL 无菌水中，在 4℃保存 1 周。加 10μL 于 10mL 培养液中，使其终浓度为 2μg/mL]，然而，不加转铁蛋白并未发现有害影响，如白细胞介素的分泌，在没有转铁蛋白的培养液里细胞生长状态更好。这种方法既适用于鼠类，也适用于人类[16,17]。

(3) 在人胸腺细胞培养过程中，省略 HC 导致细胞从增殖状态转为分化，并且增加细胞因子分泌[18]。细胞因子分泌随着传代次数增加而增多[19]。

(4) 这 3 种方法通常在 4h 内完成。如有必要，Vitrogen 包被的时间可以降低到 2h，仍可产生可接受的结果。

(5) 可以用 5d 龄以上的小鼠作为供体，但其细胞生长速度较更年幼的小鼠为慢。当人胸腺供体年龄在 2 岁以上时，我们的经验不足。然而，在幼年后期，胸腺中结缔组织和脂肪数量明显增加，使得切割和选择组织更为困难。

35

(6) 在培养过程中，胸腺碎块的黏附性不时地会被大量胸腺细胞所影响。这种情况可以通过接种前多次洗涤来预防。在小鼠胸腺上皮细胞培养的第 1 天，更换培养基不是去除胸腺细胞的好方法。然而，在人的胸腺细胞培养中可以应用该方法，未黏附的碎块重新放回培养室。

(7) 无 Vitrogen 包被的塑料板上获得黏附的胸腺的机会很小，但是塑料容器的类型要求不严格。在最初培养过程中加入血清可以促进碎块的黏附，但这不是一个好方法。尽管成纤维细胞很少且处于休眠状态，但是即使短暂地接触血清，也会导致这些成纤维细胞在几周内增殖，使得对上皮细胞功能评估的精确性受到影响。

(8) 人胸腺碎块在培养之前可以放在培养液中，在 37℃或 4℃放置过夜，或者可以

放在液氮中冻存(含有 10% DMSO 和 10%血清)。然而，其接种的效率低于新鲜组织。

(9) 胰酶消化后，培养的人上皮细胞在 10% DMSO 和 10%血清中，可以放在液氮中储存很长一段时间，并且很容易拿来以 10^5 个/mL 接种细胞。在重新培养之前，细胞应该用无血清培养液清洗数次。对于小鼠上皮细胞的冻存，我们尚缺乏经验。

(任培根 译　王希朝　段恩奎 校)

参 考 文 献

[1] Ritter, M. A., and Boyd, R. L. (1993) Development in the thymus; it takes two to tango. *Immunol. Today* **14**, 462-469.

[2] van Ewijk, W., Shores, E. W., and Singer, A. (1994) Crosstalk in the mouse thymus. *Immunol. Today* **15**, 214-217.

[3] Res, P., and Spits, H. (1999) Developmental stages in the human thymus. *Sem.Immunol.* **11**, 39-46.

[4] Shortman, K., and Wu, L. (1996) Early T lymphocyte progenitors. *Annu. Rev.Immunol.* **14**, 28-47.

[5] Anderson, G., Jenkinson, E. J., Moore, N. C., and Owen, J. J.T. (1993) MHC class II-positive epithelium and mesenchyme cells are both required for T-cell development in the thymus. *Nature* **362**, 70-73.

[6] Ernst, B. B., Surh, C. D., and Sprent, J. (1996) Bone marrow-derived cells fail to induce positive selection in thymus reaggregation cultures. *J. Exp. Med.* **183**, 1235-1240.

[7] Ropke, C. (1997) Thymic epithelial cell culture. *Microsc. Res. Tech.* **38**, 276-286.

[8] Barnes, D., and Sato, G. (1980) Methods for growth of cultured cells in serum-free medium. *Anal. Biochem.* **102**, 255-270.

[9] Barnes, D. W., and Sato, G. H. (1980) Serum-free culture: a unifying approach. *Cell* **22**, 649-655.

[10] Farr, A. G., Eisenhardt, D. J., and Anderson, S. K. (1986) Isolation of thymic epithelium and an improved method for its propagation *in vitro*. *Anat. Rec.* **216**, 85-94.

[11] Galy, A. H. M., Hadden, E. M., Touraine, J.-L., and Hadden, J. W. (1989) Effects of cytokines on human thymic epithelial cells in culture: IL-l induces thymic epithelial cell proliferation and change in morphology. *Cell. Immunol.* **124**, 13-27.

36

[12] Singer, K. H., Harden, E. A., Robertson, A., Lobach, D. F., and Haynes, B. F (1985) *In vitro* growth and phenotypic characterization of mesoderma-derived, and epithelial components of normal and abnormal human thymus. *Hum. Immunol.* **13**, 161-176.

[13] Sun, T.-T., Bonitz, P., and Burns, W. H. (1984) Cell culture of mammalian thymic epithelial cells: growth, structural, and antigenic properties. *Cell. Immunol.* **83**, 1-13.

[14] Munoz-Blay, T., Benedict, C. V., Picciano, P. T., and Cohen, S. (1987) Substrate requirements for the isolation and purification of thymic epithelial cell. *J. Exp. Pathol.* **3**, 251-258.

[15] Nieburgs, A. C., Picciano, P. T., Korn, J. H., MacAlister T., Allred, C., And Cohen, S. (1985) *In vitro* growth and maintainance of two morphologically distinct populations of thymic epithelial cells. *Cell. Immunol.* **90**, 439-450.

[16] Röpke, C., Petersen, O. W., and van Deurs, B. (1990) Short-term cultivation of murine thymic epithelial cells in a growth factor defined serum-free medium. *In Vitro Cell. Dev. Biol* **26**, 671-681.

[17] Röpke, C., and Elbroend, J. (1992) Human thymic epithelial cells in serum-free culture: nature and effects on thymocyte cell lines. *Dev. Immunol.* **2**, 111-121.

[18] Andersen, A., Pedersen, H., Bendtzen, K., and Ropke, C. (1993) Effects of growth factors on cytokine production in serum-free cultures of human thymic epithelial cells. *Scand. J. Immunol.* **38**, 233-238.

[19] Petersen, H., Andersen, A., and Röpke, C. (1994) Human thymic epithelial cells in serum-free culture. Changes in cytokine production in primary and successive culture periods. *Immunol. Lett.* **41**, 43-48.

37

第5章　胆管上皮细胞的培养

Alphonse E. Sirica

1　引言

1985年，我们首次描述了一种非转化性、完全分化的增生性胆管上皮细胞原代培养方法，其高纯度、高产率的上皮细胞是从胆管结扎大鼠的肝脏分离得到的[1]。随后，人们陆续报道了包括正常成年[2~4]及胆管结扎大鼠[5~7]、正常成年[8,9]及胆管结扎小鼠[10,11]、叙利亚金黄仓鼠[12]、豚鼠[13]、猪[14]、虹鳟鱼[15]及正常人[16,17]和患者肝脏[18]中分离得到的肝内胆管上皮细胞的培养模型。此外，实验动物及人肝外胆管和胆囊上皮细胞原代培养的模型也已建立[5,8,12,19,20]；应用猿猴病毒40(SV40)永生化的小鼠[21]、人[22]肝内胆管上皮细胞系及几种胆管瘤细胞系[23]都已建系成功，这些培养模型的建立对于体外研究胆管选择性功能和病理生理学具有重要价值。

毫无疑问，在过去的10~15年内，分离培养正常的、增生性的和恶性肿瘤性胆管上皮细胞技术的进步，使我们在胆管细胞生物学、生理学、病理学和病理生理学方面的研究取得了突飞猛进的进展[24~26]。本章主要介绍实验室常用的3种培养方法，其中两种是

38

大鼠非转化性高度分化的增生性胆管上皮分离和培养模型[27,28]，第3种是新生大鼠胆管瘤细胞培养模型[29]。

第一种方法是在我们实验室1985年[1]建立的分离培养胆管结扎6~15周后大鼠肝脏非转化性增生性胆管上皮细胞方法的基础上完善和修改而来的[27]。3.2 详细地介绍了胆管结扎7周/呋喃处理6周大鼠非转化性增生性胆管上皮细胞的分离培养方法[28]。该方法最初报道于1994年，是唯一的一个肝内胆管增生性模型，其中实验鼠的肝脏几乎完全被高度分化的胆管取代[30]。3.3 详细地介绍了新生大鼠胆管瘤细胞系建立的步骤，细胞来源于经呋喃长期致癌大鼠的转移性胆管瘤细胞[29]。我们分别应用这些胆管上皮细胞培养模型研究增生性与恶性肿瘤性胆管上皮细胞生长和形态发生方面分子调控机制的差异，并且在体外验证一些新的治疗方法是否能够选择性抑制胆管瘤细胞的生长[31]。在下述实验方法中，除了叙述基本步骤外，也介绍一些相关的基本原理。

2　材料

本章各方法中所使用的试剂均为组织培养级或高纯度级。所有试剂和组织培养基配制都是新鲜的，并且是在无菌条件下完成的。

2.1　胆管结扎大鼠非转化性高度分化的胆管上皮细胞的分离和培养

(1) 手术结扎胆管后6~15周的成年Fischer 344 雄性大鼠。

(2) 温控水浴锅。

(3) 恒流泵(peristaltic pump)。

(4) 解剖器具。

(5) 塑料细齿梳。所用的塑料齿梳可在宠物用具店买到，样式如图 5.1 所示。

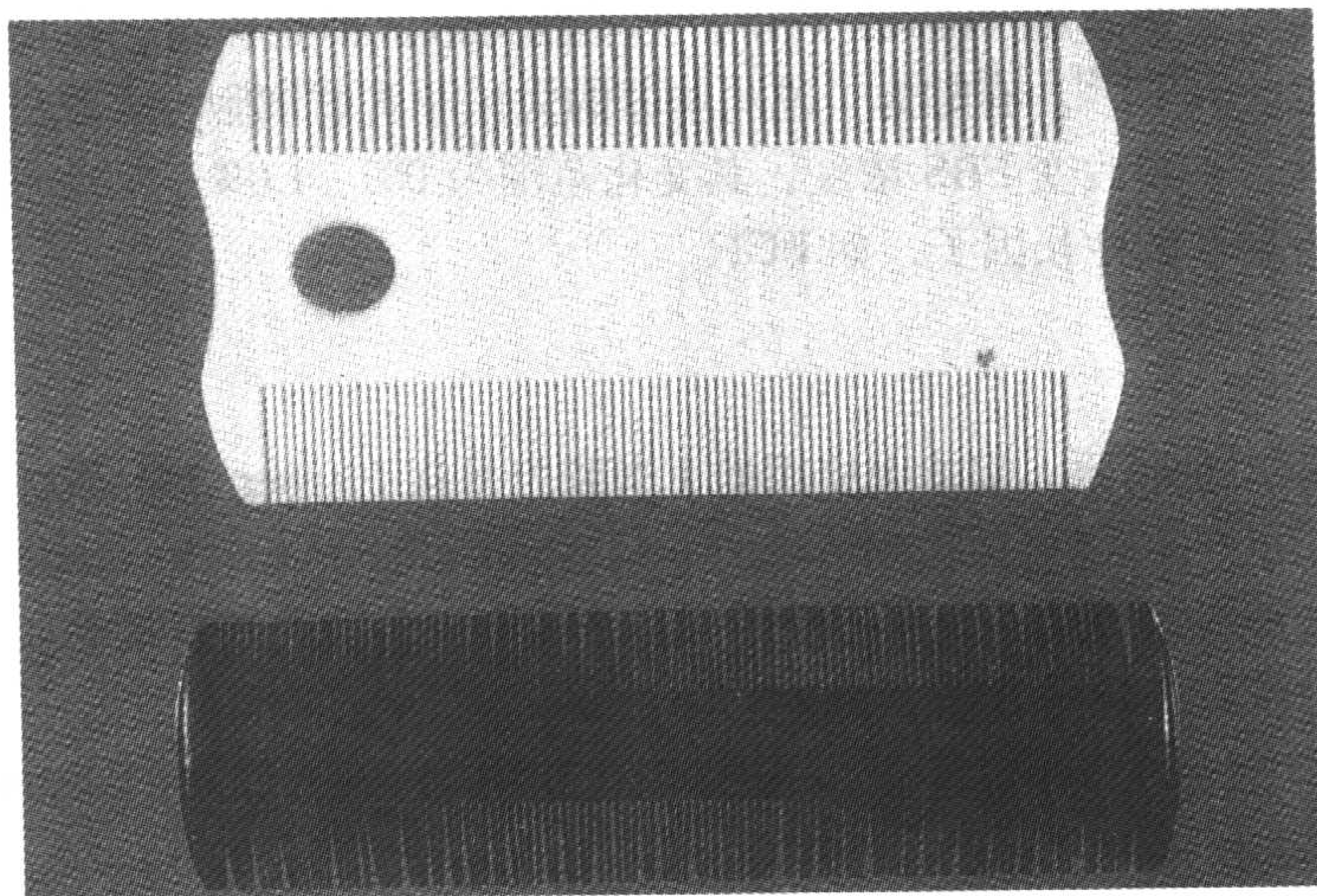


图 5.1 细齿梳能够从 I 型胶原酶灌流的胆管结扎大鼠肝实质中分离完整的肝内胆管

(6) 灌流液：Swim 氏 S77 培养液，pH7.4，添加 1g/L 的 BSA，26mmol/L $NaHCO_3$，8.3mmol/L α-*D*(+)葡萄糖，0.1μmol/L 胰岛素，2000U/L 肝素，2mmol/L *L*-谷氨酸盐，85μmol/L *L*-半胱氨酸，100 000U/L 青霉素 G 和 100mg/L 硫酸链霉素。(以上试剂均为 Sigma 公司产品。)

(7) I 型胶原酶(Sigma)。

(8) 95% O_2/5%CO_2。

(9) DNase I (Sigma)。

39

(10) 酶溶液：Leibowitz L-15 组织培养液，pH7.4，添加 1g/L 的 BSA，36mmol/L 4-(2-羟乙基)1-磺酸哌嗪乙烷(piperazineethanesulfonic acid，HEPES)，8.3mmol/L α-*D*-葡萄糖，0.1μmol/L 胰岛素，2mmol/L *L*-谷氨酸盐，3%胎牛血清(FBS)，100 000U/L 青霉素 G，100mg/L 硫酸链霉素，360 000U/L 的 I 型胶原酶，130 000U/L DNase I，700 000U/L 的透明质酸酶(III 型)和 100mg/L 大豆胰蛋白酶抑制因子(type I-S)(sigma)。

(11) Nitex Swiss 尼龙单丝(monofilament)滤膜：孔径范围 20~253μm(TETKO，Elmford，NY)。

(12) 在 12mL 离心管中，预先加入 4mL 90%的等渗 Percoll，然后取 6mL 用 L-15 培养液配制的 32%等渗 Percoll(Amersham Pharmacia)，pH7.4，放在 90%等渗 Percoll 的上面。

(13) 浓度标志珠(Amersham Pharmacia)是一些已知浓度的彩色小珠，可用于标定 Percoll 内浓度的梯度。它们特异的结合模式可以快速而准确地确定在 Percoll 梯度中分离到细胞的浓度。

(14) 台盼蓝。

(15) L-15 培养液。用于 Percoll 梯度离心后洗涤，可以使用 pH7.4 未补加其他物质

的 L-15 培养液或按上述方法补充青霉素和链霉素的 L-15 培养液。

40 (16) 生长培养液：pH7.4 的 DMEM(Life Technologies)或添加 5μg/mL 转铁蛋白的 L-15 培养液，0.1μmol/L 胰岛素，100U/mL 青霉素，100μg/mL 链霉素再加入 5%或 10%的 FBS。通常，我们选择添加 10%的 FBS，为了获得最佳细胞扩增，在培养基中又加入 25ng/mL 表皮生长因子[28]。有时为了说明培养的大鼠胆管瘤细胞与大鼠肝内胆管细胞生长和分化的差异，需要改变 FBS 浓度，其变化范围为 0%、1.0%、5.0%和 10.0%，以及选择是否添加特异性的生长因子，如 EGF。

2.2 基质

(1) I 型大鼠尾腱胶原。实验中应用的 I 型胶原是从 Fischer 344 雄性大鼠的尾腱中提取的[32,33]，也可直接从供应商如 Becton Dickinson/Collaborative Biomedical 处购买。过去在实验室包被塑料培养皿，现在可使用 Biocoat 预先包被的塑料培养皿。此处，使用的是用大鼠尾腱胶原制备的 I 型胶原基质[27,28,32,33]。

(2) Biocoat 出品的 I 型胶原包被的多孔培养板(Becton Dickinson/Collaborative Biomedical Product)。

41 (3) 基质胶(Matrigel)(Becton Dickinson/Collaborative Biomedical Product)。尽管曾有报道指出，当将大鼠增生性胆管上皮细胞同基质胶以低浓度包被培养时，细胞增长呈明显的腺泡样结构[27]，但现在已不再使用基质胶。我们认为，研究体外胆管发生时最佳基质是 I 型大鼠尾腱胶原凝胶(如图 5.2 和图 5.3 所示)[28]，并且，还应根据被研究细胞的特点和功能选用不同的基质。在常规培养中，使用 Biocoat I 型胶原包被的培养皿，当研究体外形态发生和细胞增殖时，则使用 I 型大鼠尾腱胶原进行包被。

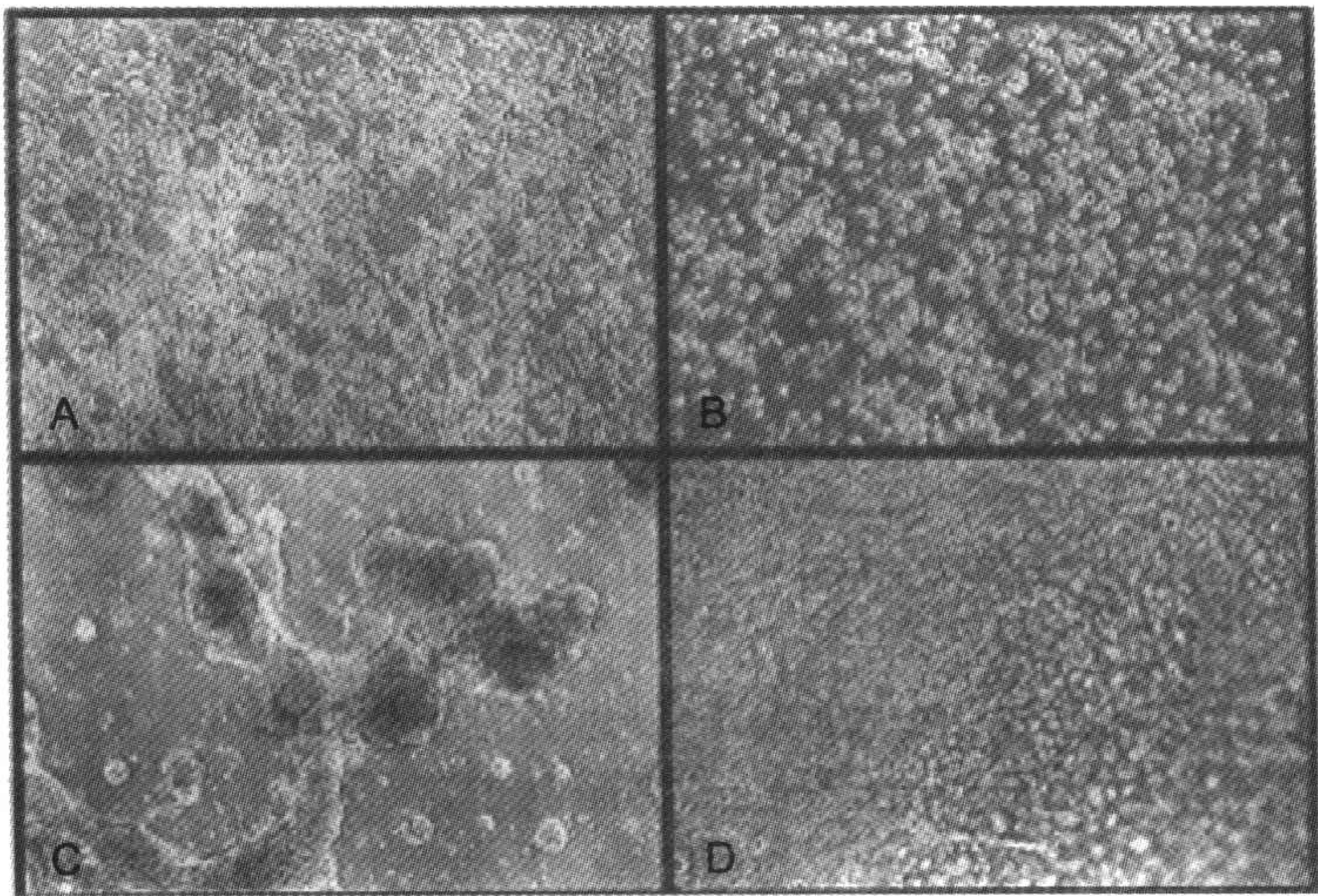


图 5.2 大鼠胆管瘤细胞和增生性胆管上皮细胞体外培养结果的相差显微镜照片

(A)非转化性大鼠肝内增生性胆管上皮细胞在 I 型大鼠尾胶原凝胶上原代培养 4h 的相差显微照片(×33)。(B)大鼠胆管瘤细胞在 I 型鼠尾胶原凝胶上原代培养 4h 的相差显微镜照片(×33)。(C)大鼠肝内增生性胆管上皮细胞原代凝胶培养 7d 后形成的三维分支胆管样结构的相差显微镜照片(×13)。(D)大鼠胆管肿瘤上皮细胞在 I 型胶原凝胶基质层中原代培养的相差显微镜照片，注意培养细胞的明显堆叠(×13)

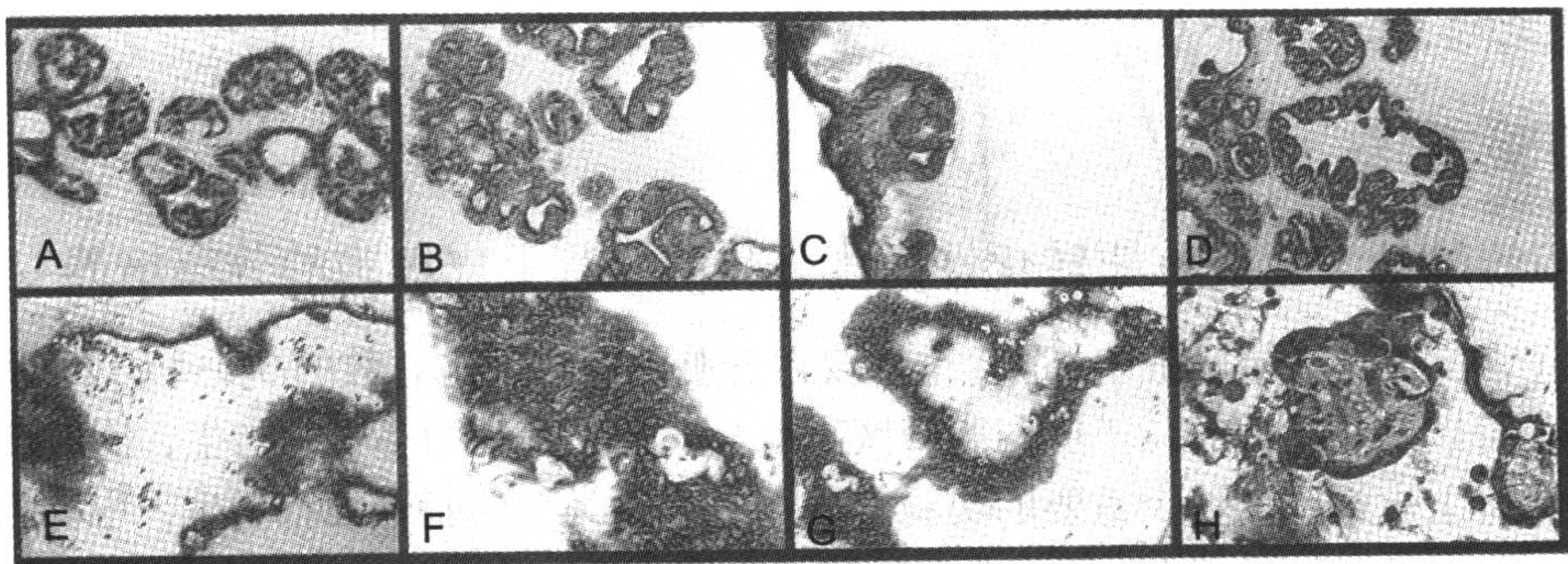


图 5.3 大鼠增生性胆管上皮细胞和大鼠胆管瘤细胞体外培养结果分析

(A)在光镜下原代培养 7d 的非转化性大鼠肝内增生性胆管上皮细胞呈现大量的管样结构(苏木精-伊红，×132)。(B 和 C)免疫组化结果表明，在原代凝胶培养中已形成胆管样结构的大鼠增生性胆管上皮细胞，在胞质中细胞角蛋白-19 呈强烈的免疫活性(×132)。(D)在原代凝胶培养中形成胆管样结构的大鼠增生性胆管上皮细胞，黏蛋白免疫组化染色反应呈阴性(黏蛋白卡红，×132)。(E)在原代凝胶基质中培养 4d 大鼠胆管瘤细胞的光镜照片。注意恶性瘤性上皮细胞在培养基表面的堆叠及在胶原凝胶中形成的腺癌性腺管样结构(苏木精-伊红，×33)。(F 和 G)原代大鼠胆管瘤细胞胞质表现对细胞角蛋白 19 强烈的免疫反应性。注意在(F)中，胆管瘤细胞为更常见的堆叠形式，而在图(G)中，它们则在凝胶中形成腺癌性腺管样结构(×132)。(H)大鼠胆管瘤细胞在原代凝胶培养中呈黏蛋白组织化学染色反应阳性(品红染色，×132)[E、F、H 图片来自参考文献[29]，得到 *Carcinogenesis* 杂志(牛津大学出版社)的允许]

2.3 胆管结扎/呋喃处理大鼠非转化性高度分化的胆管上皮的分离和培养

(1) 青年雄性 Fischer 344 大鼠。

(2) 含有呋喃的玉米油(Sigma)。从胆管结扎后 1 周开始，按平均每千克体重 45mg 将呋喃溶于玉米油中灌饲大鼠(每日清晨 1 次)，每周 5 次，连续进行 6 周。按照大鼠数量每周配制储液 2 次，饲喂玉米油的剂量为体重的 1.0%。因此，对于 5 只体重 200g 的大鼠，每次需将 45mg 呋喃配制成终体积为 1.0mL 的玉米油溶液，每只鼠饲喂 0.2mL。

(3) 分离培养液：Leibovitz L-15 培养液，pH7.4，添加 1mg/mL BSA，36mmol/L HEPES，8.3mmol/L α-*D*-葡萄糖，0.1μmol/L 胰岛素，2mmol/L *L*-谷氨酸盐，100U/mL 青霉素，100μg/mL 链霉素，5μg/mL 转铁蛋白，10^{-8}mol/L 地塞米松(Sigma)，3%FBS，1 140U/mL I 型胶原酶，0.1mg/mL DNase I，1mg/mL III 型透明质酸酶和 0.1mg/mL I-S 型大豆胰蛋白酶抑制因子。

(4) 生长培养液 2：Leibovitz L-15 培养液或 DMEM 补以 8.3mmol/L α-*D*-葡萄糖，0.1μmol/L 胰岛素，5μg/mL 转铁蛋白，100U/mL 青霉素，100μg/mL 链霉素，10%FBS 和 25ng/mL EGF。

(5) 大鼠尾腱 I 型胶原凝胶。制作方法大致如下[32,33]：准备凝胶溶液，在 10×组织培养液(如 Life Technologies 公司出品的 Waymouth MB 752/1)中以 1.15∶2.7 的比例加入 0.34mol/L NaOH。要在直径 35mm 塑料培养皿中准备胶原凝胶，首先加入 1.0mL 大鼠尾腱 I 型胶原溶液，缓慢旋转使溶液覆盖培养皿底部，然后迅速加入凝胶溶液约 0.3mL，旋转培养皿与胶原混合，然后静止凝胶。胶原凝胶的最终 pH 约为 7.4。I 型胶原溶液批次不同凝胶条件也需要改变，因此，需要实验摸索才能确定最佳的凝胶条件。此外，胶原/NaOH 凝胶溶液也可以先在冰上混合，然后将混合物移入组织培养皿中。低温可以延

42

迟凝胶过程，37℃则加速凝胶过程。在细胞接种前，先在胶原上覆盖 1.0mL 未添加任何物质的 Leibovitz L-15 或 DMEM，pH7.4，然后在 37℃组织培养箱中放置 4h。

3 实验方法

3.1 胆管结扎大鼠肝脏非转化性高度分化的胆管上皮细胞的分离培养

在正常的成年大鼠肝脏中，胆管上皮仅占肝脏内有核细胞总数的 3%~5%[34]。将大鼠胆管结扎可以刺激大部分位于肝门胆管区高度分化的胆管和胆小管的增生，因此成为扩增肝脏胆管上皮细胞的一个重要的实验模型[35]。这种类型的胆管细胞增生，也称为典型胆小管增生[23,34,35]。图 5.4A 即为典型的胆管细胞增生，它是已存肝门胆管/胆小管扩增的结果，从而导致肝内胆管分支的延长。从胆管结扎大鼠肝脏获得的胆管/胆小管上皮细胞具有如下特点：大部分保留原细胞的表型和功能特性[5,34]，保留着朝肝脏细胞系分化的能力[1,27,36,37]，双倍体染色体组型，在细胞培养中为非转化性[1]，培养寿命有限[见注意事项(1)] [27]，在将细胞移植体内时不会发生癌变[1,37]。

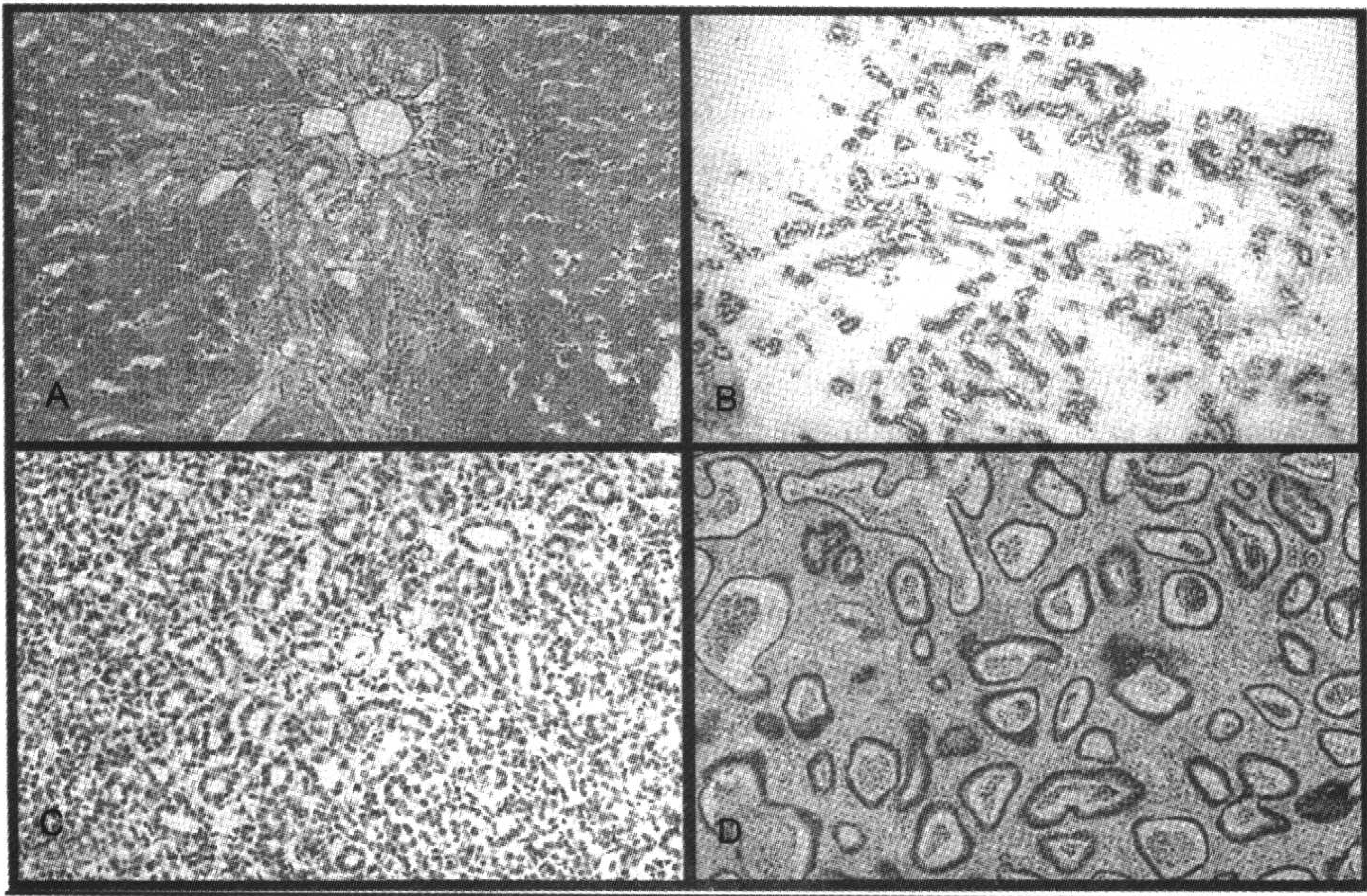


图 5.4 典型的胆管细胞增生

(A)胆管结扎后 7 周在应用 I 型胶原酶原位灌注肝脏前，大鼠肝脏胆小管典型增生的光镜图片(苏木精-伊红染色，×66)。(B)胆管结扎数周后从肝脏分离的新鲜增生性胆管组织的光镜照片。增生性胆管上皮细胞γ -谷氨酸转肽酶免疫组化反应为阳性(×13)。(C)胆管结扎 7 周/呋喃饲喂 6 周大鼠右肝叶的组织切片，可见整个肝实质都被高度分化的增生性胆管组织取代(苏木精，×33)。(D)以呋喃诱导肝内胆管瘤为来源的转移性大鼠胆管瘤的组织病理学切片

图 5.5 展示了修改后的实验步骤，用于建立从胆管结扎成年大鼠肝脏分离高产量、高寿命及高纯度的非转化性高度分化的胆管上皮细胞群的原代培养[见注意事项(2)]。具体步骤如下：

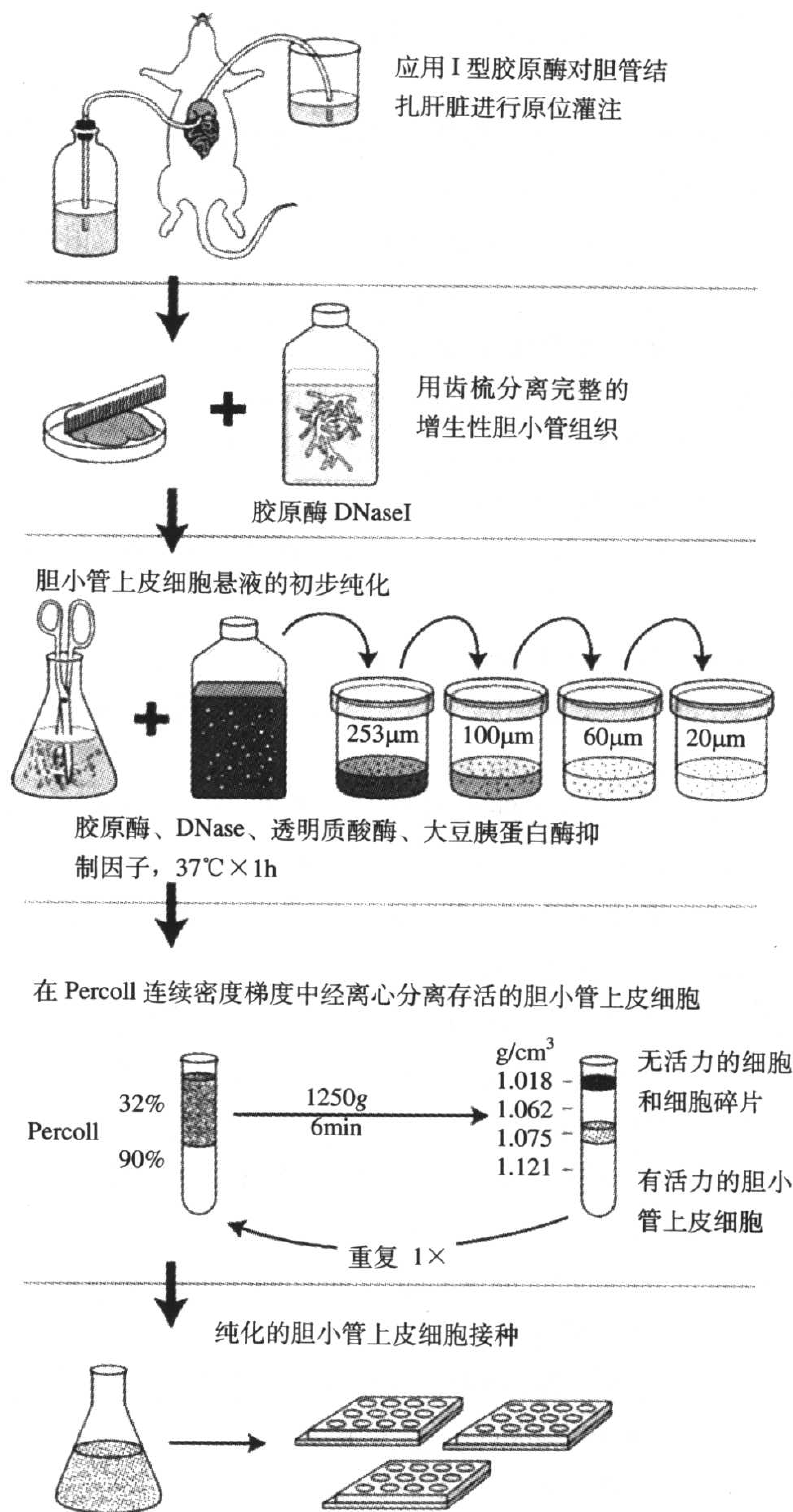


图 5.5　胆管结扎后 6~15 周肝脏非转化性高度分化的增生性胆管上皮细胞分离培养的步骤图解
该图解引自参考文献[27]并加以修改，得到了 *Cancer Research* 杂志(American Association for Cancer Research，Inc.)的允许

(1) 胆管结扎后 6~15 周用灌流液经肝门静脉原位灌注大鼠肝脏。
(2) 使用温控水浴锅将灌流液的温度保持 37℃。
(3) 使用恒流泵(peristaltic pump)将灌注流量控制在 12mL/min。
(4) 在原位灌注期间，连续向灌流液中输入 95%O_2/5%CO_2。
(5) 15min 后，向灌流液中加入 220 000U/L 胶原酶。
(6) 在直径 150mm 的塑料或玻璃培养皿中加入预冷的灌流液，然后将肝脏小心移入

其中。

(7) 用图 5.1 所示的细齿梳轻轻梳理肝脏，从酶解的肝实质和窦状隙分离完整的增生性胆管组织。

(8) 为了获得较纯的增生性胆管组织，将梳出的组织片段置于装有 100mL 灌流液的瓶中，37℃、10min，在灌流液中需添加 30 000U 胶原酶和 13 000U DNase I。

(9) 以下步骤为清除胆管组织片段中残余的肝实质细胞。如图 5.4B 所示，在此条件下分离的增生性胆管组织主要由可以选择性对 γ-谷氨酸转肽酶免疫组化反应呈阳性[见注意事项(3)]，并且仅被疏松纤维化基质支持的肝内胆管构成。

(10) 在 50mL 酶溶液中消化分离的胆管组织片段。

(11) 将混合物置于温控摇式水浴锅中 37℃温和摇动 50min。

(12) 将粗制的胆管细胞悬液置于冰上冷却至 4℃。

(13) 分别用 20~253μm 孔径的 Nitex Swiss 单丝(monofilament)尼龙滤膜进行连续过滤。

(14) 将细胞滤液于 4℃、850*g* 离心 10min，得到粗制的非肝实质性细胞。

(15) 用 32%等渗 Percoll 重悬细胞，置于 12mL 离心管中 90%等渗 Percoll 的上面。

(16) 4℃、1250*g* 离心 6min。

(17) 通过经济适用的浓度标志珠与存活的增生性胆管上皮细胞结合，可以知道这些细胞的密度处于 1.065~1.075g/cm^3。平行放置的 Percoll 中一个含有细胞，另一个含有彩色浓度标志珠，离心后，其密度在它们设定的密度处显带。通过细胞梯度带与有色标志珠所形成带的对比，即可得知细胞的密度。

46

(18) 收集结合的细胞在 L-15 培养液中洗涤，可以直接使用未加以任何物质的 L-15 培养液，也可以是加以 100U/mL 青霉素及 100μg/mL 链霉素的 L-15 培养液。

(19) 重复 Percoll 梯度离心步骤。

(20) 从 Percoll 梯度中相同密度区分离出最终的增生性胆管上皮细胞。

(21) L-15 培养液中洗涤。

(22) 应用台盼蓝染色排除法确定细胞的活力。

(23) 应用血细胞计进行细胞计数。

(24) 在预先用 I 型大鼠尾腱胶原包被的塑料组织培养皿中，将分离的胆管上皮细胞以 4×10^6~6×10^6 个/cm^2 的密度接种便于形成单层。

(25) 将分离的胆管上皮细胞接种于 I 型胶原[27,28]或基质胶[27]上原代培养，细胞能够稳定生长。虽然，细胞在 Matrigel 上培养生长良好，但在研究中并不用其作为基质层。这些大鼠胆管细胞能在一系列不同细胞外基质替代物上有效生长。

(26) 将大鼠增生性胆管上皮细胞置于生长培养液中培养。通常这些细胞在装有标准水的(standard water-jacketed)CO_2 培养箱中接种于 I 型胶原包被的培养皿或在 I 型胶原凝胶上培养，每日更换一次培养基。但这些细胞一般很难进行传代培养，如果对胶原包被培养的细胞应用胰蛋白酶，在胶原凝胶上培养的细胞应用 I 型胶原酶，在基质胶上培养的细胞混合应用中性蛋白酶和 I 型胶原酶进行温和酶解，那么也可以进行有限次数(如 4~6 次)的传代培养。

3.2 胆管结扎/呋喃饲喂大鼠非转化性高度分化的胆管上皮细胞的分离培养

如前所述，1994 年我们建立了一个肝内胆管大量增生的模型，其中肝脏几乎完全被非转化性高度分化的增生性胆管取代[30]。我们利用该模型建立了一个比较简单的分离步骤，可以从胆管结扎 7 周/呋喃饲喂 6 周大鼠切除的大部分右侧肝叶和一部分间叶获得和培养大量高纯度、存活的增生性二倍体胆管上皮细胞[见注意事项(4)]。步骤图解见图 5.6A。因为在切除的肝脏组织中即使不是全部也是大部分由增生性胆管组织组成，因此，可以省去 3.1 中酶灌注和齿梳梳理的步骤。 47

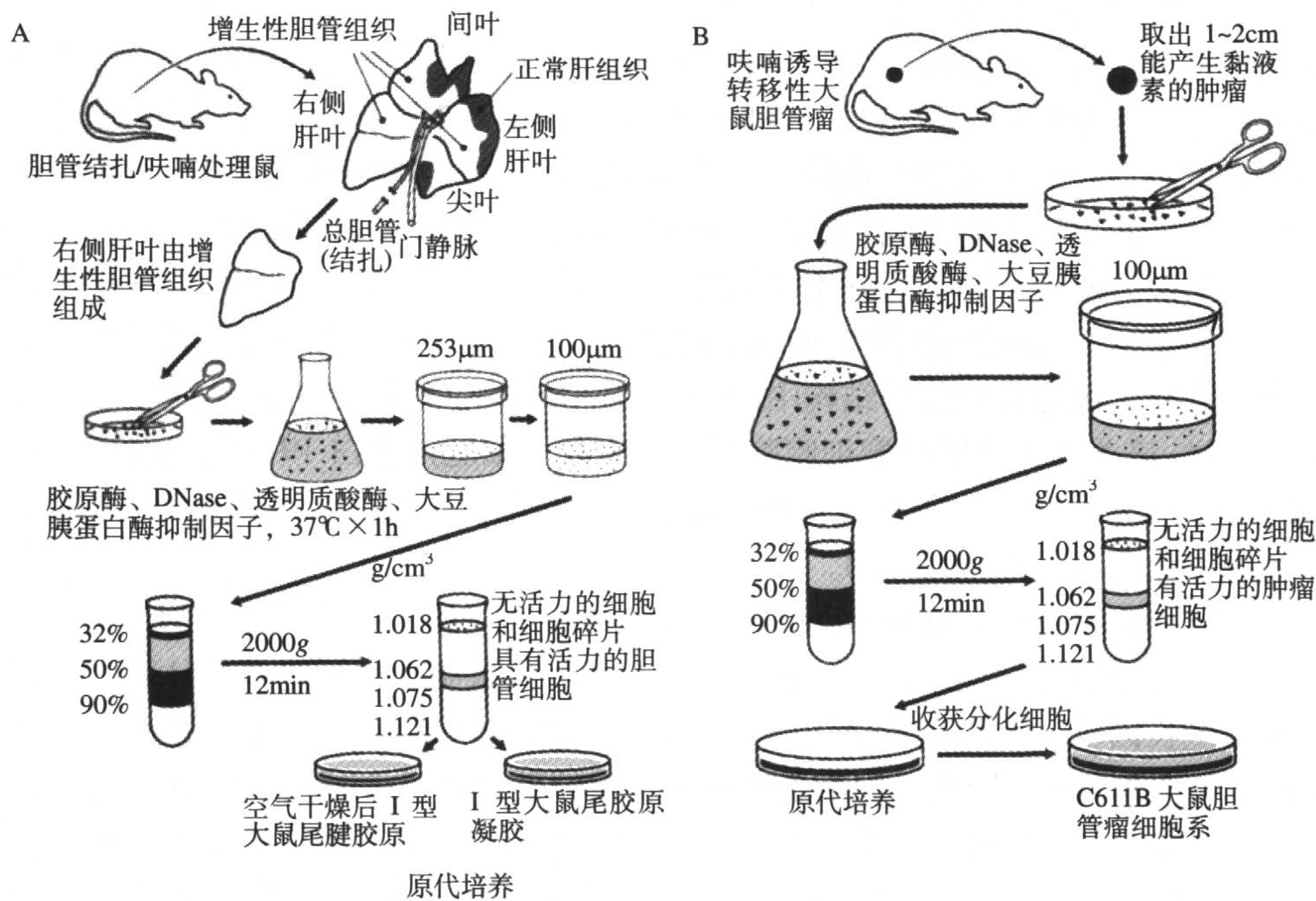


图 5.6 大鼠胆管上皮细胞分离培养方法图解

(A)胆管结扎 7 周/呋喃饲喂 6 周大鼠右侧肝叶中非转化增生性胆管上皮细胞的分离培养方法图解。此图解对图 5.1 稍加修改，最初刊登于参考文献[28]，在此处引用得到 *Hepatology* 杂志(W. B. Saunders)的允许。(B)呋喃诱导的转移性大鼠胆管瘤中恶性胆管上皮细胞的分离培养图解。来自参考文献[29]，此处引用得到 *Carcinogenesis* 杂志的允许

(1) 对大鼠进行胆管结扎手术：先找到总胆管，进行双结扎，然后由两结扎点中间剪断。

(2) 一周后，将呋喃溶于玉米油中以每千克体重 45mg 饲喂。

(3) 饲喂时每日 1 次，每周 5 次，连续进行 6 周。

(4) 图 5.4C 为胆管结扎 7 周/呋喃处理 6 周大鼠右侧肝叶横切的光镜图片，其中整个正常肝实质已被由纤维化基质包围的增生性高度分化的胆管组织取代。

(5) 从大鼠肝脏中切下右侧肝叶和一部分间叶。

(6) 如图 5.6A 所示，将切下的肝脏置于分离培养液中。

(7) 将混合液转移至瓶中，37℃，振摇作用 1h。 48

(8) 冰上冷却至 4℃。

(9) 同3.1中步骤(13)~(26)。

(10) 按上述步骤培养的胆管上皮细胞能够形成三维分支的胆管样结构，其在形态学和表型上都与在体内极化的增生性胆管/胆小管极其相似[28,30](图5.2A、C 和图5.3A~D)。

(11) 为了达到上述效果，在生长培养液2中加入大鼠尾腱胶原，将胆管上皮置于其上培养。

3.3 从呋喃诱导的转移性胆管瘤建立一个新的大鼠胆管瘤细胞系

最近，我们根据3.2所述的方法建立了唯一的一个大鼠胆管瘤细胞培养模型[29]。从由呋喃长期诱导的大鼠转移性胆管瘤(图5.4D)分离培养胆管瘤细胞的步骤如图5.6B所示。从图解可见，其实验步骤与3.2所述的胆管结扎7周/呋喃饲喂6周大鼠增生性胆管上皮细胞的分离培养步骤非常相似，只是将转移性胆管瘤细胞作为恶性细胞的来源。应用这些分离的细胞进行胆管瘤细胞的原代培养可以获得稳定的培养结果(图5.2B、D)。与大鼠增生性胆管上皮细胞不同，大鼠胆管瘤细胞在25ng/mL EGF和10%FBS存在的情况下，在I型胶原凝胶上培养通常不会形成三维胆管样结构。它们表现为丧失接触抑制性，在培养基表面上出现堆叠(图5.2D和图5.3E)，然而偶尔可在这些恶性转化细胞的胶原培养基内观察到腺癌性腺管样结构(图5.3E、G)。与凝胶培养中大鼠增生性胆管上皮细胞的表现一样，培养的大鼠胆管瘤细胞胞质中也表现对细胞角蛋白19强烈的免疫反应性(图5.3F、G)，但不同的是，这些培养的胆管瘤细胞同亲代肿瘤的新生腺管上皮相似，对黏蛋白免疫组化反应阳性(图5.3H)。

使用差异细胞收获技术(differential cell harvesting)，包括选择性胰蛋白酶消化和对培养的大鼠胆管瘤细胞进行连续传代，建立了一个新的大鼠胆管瘤细胞系C611B[29]。在不添加外源性生长因子，如EGF的基本培养条件下，C611B细胞系细胞数增殖1倍的时间是24h；在染色体分析时，72%的细胞表现非整倍体性，染色体数在43~46(二倍体数目为42)；与培养的非转化性大鼠增生性胆管上皮细胞相比，表现为原癌基因编码的受体酪氨酸蛋白激酶c-Met和c-Neu的表达上调[29]、环氧合酶-2表达异常[31]、产生肝脏细胞生长因子/分散因子(hepatocyte growth factor/scatter factor)[31]和c-Met配基。而且，当将C611B胆管瘤细胞移植入Fischer344同系大鼠腹股沟脂肪组织或肝脏时，引起能产生黏蛋白及细胞角蛋白19阳性反应的腺癌的概率为100%，并且其病理组织学特征与获得肿瘤细胞系的亲代瘤表现一致[29]。

4 注意事项

(1) 在标准培养条件下[1,27,28]，大鼠胆管增生性上皮细胞在衰老前可培养生长100~140d。然而出于对胆管上皮细胞生长调控、形态发生和功能特性的研究角度考虑，通常采用原代培养1~14d的细胞[27,28,39,40]。至今，尽管使用了一些方法，包括加入化学致癌物，如*N*-甲基-*N'*-硝基-亚硝基胍或转化性原癌基因，如活化的*neu*原癌基因，但在体外仍未观察到培养的大鼠增生性胆管上皮细胞的恶性转化。

(2) 在胆管结扎后6~12周，按照3.1所述的实验方法通常一个肝脏可获得纯度在95%的胆管上皮细胞10^7~5×10^8个，通过台盼蓝染色排除法鉴定，有活力的细胞占90%~98%。

新分离的增生性胆管上皮细胞在 Percoll 中处于 1.07g/mL 密度处，厚 10~15μm[5,36]。

(3) 免疫组化实验表明，γ-谷氨酸转肽酶特异性位于正常和胆管结扎大鼠的肝内胆管上皮。因此，γ-谷氨酸转肽酶和细胞角蛋白 19 一起成为分离正常和增生性大鼠胆管上皮的最可靠的选择性表型标志物[5,23,34]。

(4) 在 3.2 所述的实验方法中，每 3~3.5g 湿重的肝脏组织可平均产生 19.4×10^7 个胆管上皮细胞，细胞的平均存活力为(87.1±3.9)%。并且，在新分离的增生性胆管上皮细胞中，有超过 90%的细胞对 γ-谷氨酸转肽酶和细胞角蛋白 19 的染色反应表现阳性[28]。

(李　晶 译　刘泽隆　段恩奎 校)

参　考　文　献

50

[1] Sirica, A. E., Sattler, C. A., and Cihla, H. P. (1985) Characterization of a primary bile ductular cell culture from the livers of rats during extrahepatic cholestasis. *Am. J. Pathol.* **120**, 67-78.

[2] Yang, L., Faris, R. A., and Hixson, D. C. (1993) Long-term culture and characteristics of normal rat liver bile duct epithelial cells. *Gastroenterology* **104**, 840-852.

[3] Okamoto, H., Ishii, M., Mano, Y ., Igarashi, T ., Ueno, Y ., Kobayashi, K., and Toyota, T. (1995) Confluent monolayers of bile duct epithelial cells with tight junctions. *Hepatology* **22**,153-159.

[4] Vroman, B. and LaRusso, N. F. (1996) Development and characterization of polarized primary cultures of rat intrahepatic bile duct epithelial cells. *Lab. Invest.* **74**,303-313.

[5] Sirica, A. E. (1992) Biology of biliary epithelial cells, p. 63-87. In *Progress in liver diseases* (Boyer J. L. and Ockner, R. K., eds.). W. B. Saunders, Philadelphia.

[6] Strazzabosco, M., Mennone, A., and Boyer, J. L. (1991) Intracellular pH regulation in isolated rat bile duct epithelial cells. *J. Clin. Invest.* **87**, 1503-1512.

[7] McGill, J. M., Basavappa, S., and Fitz, J. G. (1992) Characterization of high-conductance anion channels in rat bile duct epithelial cells. *Am. J. Physiol.* **262**, G703-G710.

[8] Katayanagi, K., Kono, N., and Nakanuma, Y. (1998) Isolation, culture and characterization of biliary epithelial cells from different anatomical levels of the intrahepatic and extrahepatic biliary tree from a mouse. *Liver* **18**, 90-98.

[9]Yahagi, K., Ishii, M., Kobayashi, K., et al. (1998) Primary culture of cholangiocytes from normal mouse liver. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **34**,512-514.

[10] Paradis, K. and Sharp, H. L. (1989) *In vitro* duct-like structure formation after isolation of bile ductular cells from a murine model. *J. Lab. Clin. Med.* **113**, 689-694.

[11] Hu, W., Blazar, B. R., Carlos Manivel, J., Paradis, K., and Sharp, H. L. (1996) Phenotypic and functional characterization of intrahepatic bile duct cells from common duct ligated mice. *J. Lab. Clin. Med.* **128**,536-544.

[12] Asakawa, T ., Tomioka, T ., and Kanematsu, T. (2000) A method for culturing and transplanting biliary epithelial cell from syrian golden hamster. *Virchows Arch.* **436**, 140-146.

[13] Sakisaka, S., Gondo, K., Yoshitake, M., Harada, M., Sata, M., Kobayashi, K., and Tanikawa, K. (1996) Functional differences between hepatocytes and biliary epithelial cells in handling polymeric immunoglobulin A2 in humans, rats, and guinea pigs. *Hepatology* **24**, 398-406.

[14] Talbot, N. C. and Caperna, T. J. (1998) Selective and organotypic culture of intrahepatic bile duct cells from adult pig liver. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **34**, 785-798.

[15] Blair, J. B., Ostrander, G. K., Miller, M. R., and Hinton, D. E. (1995) Isolation and characterization of biliary epithelial cells from rainbow trout liver. In Vitro *Cell. Dev. Biol. Anim.* **31**,780-789.

[16] Joplin, R., Strain, A. J., and Neuberger, J. M. (1989) Immuno-isolation and culture of biliary epithelial cells from normal human liver. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **25**,1189-1192.

51

[17] Matsumoto, K., Fujii, H., Michalopoulos, G. K., Fung, J. J., and Demetris, A. J. (1994) Human biliary epithelial cells secrete and respond to cytokines and hepatocyte growth factors *in vitro*: interleukin-6, hepatocyte growth factor and epidermal growth

factor promote DNA *synthesis in vitro. Hepatology* **20**, 376-382.

[18] Joplin, R., Strain, A. J., and Neuberger, J. M. (1990) Biliary epithelial cells from the liver of patients with primary biliary cirrhosis: isolation, characterization, and short-term culture. *J. Pathol.* **162**, 255-260.

[19] Nakanuma, Y., Katayanagi, K., Kawamura, Y., and Yoshida, K. (1997) Monolayer and three-dimensional cell culture and living tissue culture of gallbladder epithelium. *Micros. Res. Tech.* **39**,71-84.

[20] Kuver, R., Savard, C., Nguyen, T. D., Osborne, W. R., and Lee, S. P. (1997) Isolation and long-term culture of gallbladder epithelial cells from wild-type and CF mice. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **33**, 104-109.

[21] Hreha, G., Jefferson, D. M., Yu, C.-H., Grubman, S. A., Alsabeh, R., Geller, S. A., and Vierling, J. M. (1999) Immortalized intrahepatic mouse biliary epithelial cells: immunologic characterization and immunogenicity. *Hepatology* **30**, 358-371.

[22] Grubman, S. A., Perrone, R. D., Lee, D. W., et al. (1994) Regulation of intracellular pH by immortalized human intrahepatic biliary epithelial cell lines. *Am. J. Physiol.* **266**, G1060-G1070.

[23] Sirica, A. E., Gainey, T. W., Harrell, M. B., and Caran, N. (1997) Cholangiocarcinogenesis and biliary adaptation responses in hepatic injury. p229-290. In: *Biliary and pancreatic ductal epithelia-pathobiology and pathophysiology*. (Sirica A. E. and Longnecker, D. S., eds.). Marcel Dekker, New York.

[24] Sirica A. E. and Longnecker, D. S. eds.) (1997) *Biliary and pancreatic ductal epithelia-pathobiology and pathophysiology*, p. 1-575. Marcel Dekker, Inc., New York, Basel and Hong Kong.

[25] Baiocchi, L. LeSage, G.,Glaser, S., and Alpini, G. (1999) Regulation of cholangiocyte bile secretion. *J. Hepatol.* **31**, 179-191.

[26] Strazzabosco, M., Spirli, C., and Okolicsanyi, L. (2000) Pathophysiology of the intrahepatic biliary epithelium. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **15**,244-253.

[27] Mathis, G. A., Walls, S. A., and Sirica, A. E. (1988) Biochemical characteristics of hyperplastic rat bile ductular epithelial cells cultured "on top" and "inside" different extracellular matrix substitutes. *Cancer Res.* **48**,6145-6152.

[28] Sirica, A. E. and Gainey, T. W. (1997) A new rat bile ductular epithelial cell culture model characterized by the appearance of polarized bile ducts *in vitro. Hepatology* **26**,537-549.

[29] Lai G.-H. and Sirica, A. E. (1999) Establishment of a novel rat cholangiocarcinoma cell culture model. *Carcinogenesis* **20**,2335-2339.

[30] Sirica, A. E., Cole, S. L., and Williams, T. (1994) A unique rat model of bile ductular hyperplasia in which liver is almost totally replaced with well-differentiated bile ductules. *Am. J. Pathol.* **144**, 1257-1268.

[31] Sirica, A. E., Lai, G.-H., and Zhang, Z. (2001) Biliary cancer growth factor pathways, cyclo-oxygenase-2 and potential therapeutic strategies. J. *Gastroenterol. Hepatol.* **16**, 363-372.

52

[32] Michalopoulos, G. and Pitot, H. C. (1975) Primary culture of parenchymal liver cells on collagen membranes. *Exp. Cell Res.* **94**, 70-78.

[33] Sirica, A. E., Richards, W., Tsukada, Y., Sattler, C. A., and Pitot, H. C. (1979) Fetal phenotypic expression by adult hepatocytes on collagen gel/nylon meshes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**, 283-287.

[34] Sirica, A. E., Mathis, G. A., Sano, N., and Elmore, L. W. (1990) Isolation, culture, and transplantation of intrahepatic biliary epithelial cells and oval cells. *Pathobiology* **58**, 44-64.

[35] Sirica, A. E. (1995) Ductular hepatocytes. *Histol. Histopathol.* **10**, 433-456.

[36] Sirica, A. E., Elmore, L. W., and Sano, N. (1991) Characterization of rat hyperplastic bile ductular epithelial cells in culture and *in vivo. Dig. Dis. Sci.* **36**, 494-501.

[37] Sirica, A. E. (1996) Biliary proliferation and adaptation in furan-induced rat liver injury and carcinogenesis. *Toxicol. Pathol.* **24**, 90-99.

[38] Sirica, A. E., Radaeva, S., and Lai, G.-H. (1999) Proliferation and Ductal morphogenesis of bile duct epithelial cells, p. 3-20. *In Diseases of the liver and the bile ducts-new aspects and clinical implications* (_pi_ák, J., Boyer, J., et al.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

[39] Mathis, G. A., Walls, S. A., D' Amico, P., Gengo, T., and Sirica, A. E. (1989) Enzyme profile of rat bile ductular epithelial cells in reference to the resistance phenotype in hepatocarcinogenesis. *Hepatology* **9**,477-485.

[40] Mathis, G. A. and Sirica, A. E. (1990) Effects of medium and substratum conditions on the rates of DNA synthesis in primary cultures of bile ductular epithelial cells. *In Vitro Cell. Dev. Bioi.* **26**, 113-118.

第6章　肝脏上皮细胞的培养

53

Rolf Gebhardt

1　引言

已有很多研究者报道了利用新生大鼠或成年大鼠肝脏建立肝脏上皮细胞系(株)[1~6]。这些细胞系的细胞体积比肝脏细胞更小，形态比肝脏细胞更简单，而且具有相当大的生长潜力，易于传代。与此不同的是，大鼠肝脏实质细胞的培养如果不加入生长因子则不增殖[7]；胆上皮细胞在培养过程中能迅速增殖，但是在缺少生长因子如杂交瘤生长因子(hybridoma growth factor,HGF)时，也不能简单地进行传代培养[8,9]。肝脏上皮细胞也与分离的卵圆细胞行为不同，卵圆细胞在培养过程中不容易增殖[10]。尽管如此，有研究表明肝脏上皮细胞与卵圆细胞有一定关系[11]，但尚需进一步证实。由于其他一些非肝脏细胞没有表现出上皮细胞的形态，所以这些上皮细胞也不大可能来自这些非肝脏细胞。综上所述，尽管人们利用多种酶范型(enzyme pattern)和其他抗原试图描述这些细胞系的特性，但对它们的最终前体目前仍不清楚[5,6,12~15]。

妨碍探索这些细胞克隆起源的一个非常重要的原因是在进行染色体核型分析时，发现这些细胞在染色体的数量和组成上不断变化。当然，这种变化也导致了这些细胞表现型的许多变化，也可以解释在过去的几十年内为何建立了如此多的细胞系(株)。因此有人猜测这些细胞可能与数量极少的肝脏干细胞有联系[12]。有报道称这些上皮细胞与胆管上皮细胞一样可转化为肝脏细胞[16~18]。这种报道真实与否，还需要仔细研究。因此如果能设计一种培养条件，使之既有利于细胞染色体组型的稳定，又不影响克隆发生，则是一项有价值的挑战。另一方面，对于这些上皮细胞的研究可能明显地促进对肝癌发生的了解[16,19]。此外，上面提到的通常在培养中表现的遗传不稳定性(genetic instability)可能反映了体内的一些基本机制，即这种不稳定性在体内也可能偶尔发生或由于致癌因子所引起。采用这些细胞，可以研究肝脏上皮细胞生长和凋亡过程中遗传不稳定性的发展和结果，这些过程可能类似于肝癌的发生过程。由于这些前景和优点，下面提供的建立肝脏上皮细胞系的方法可能不仅仅只是一个用于分离未知细胞群的方法。

54

对新生大鼠肝脏[3,4,15,20]和成年大鼠肝脏[12,21]上皮细胞进行分离的方案已有一些报道。通常而言，新生大鼠肝脏优于成年大鼠肝脏，如果需要大量的细胞，来自新生鼠肝脏和成年鼠肝脏的细胞在质量上的差异不容忽视[6]。基于已发表的各种改进的分离技术，我们发展了如下的实验方案，采用这种方案，无论使用怎样的初始材料，均能得到大量克隆生成能力高的肝脏上皮细胞。

2　材料

(1) Hank 溶液(添加 HEPES)：8g/L NaCl、0.4g/L KCl、0.1g/L $MgSO_4(7H_2O)$、0.1g/L

$MgCl_2(6H_2O)$、0.06g/L $Na_2HPO_4(2H_2O)$、0.06g/L KH_2PO_4、0.01g/L $CaCl_2$、0.48g/L HEPES，溶于双蒸水中，调节 pH 至 7.4。0.22μm 滤器过滤除菌，4℃下可保存 6 个月。

(2) 无钙 Hank 溶液(不含 HEPES)：从上面配方中除去氯化钙和 HEPES。

(3) 0.2%(*m*/*V*)胰蛋白酶，溶于无钙 Hank 溶液。

(4) Williams 溶液 E：配方中没有谷氨酰胺，在 4℃下储存数月，使用前加入 2mmol/L *L*-谷氨酰胺。

(5) 分离液：135mmol/L NaCl、5.4mmol/L KCl、1.2mmol/L $MgSO_4(7H_2O)$、0.79mmol/L $Na_2HPO_4(2H_2O)$、0.15mmol/L KH_2PO_4、1mmol/L $CaCl_2$、10mmol/L HEPES、0.1%葡萄糖，溶于双蒸水中，调节 pH 至 7.4。0.22μm 滤器过滤除菌，4℃下可保存 6 个月。

(6) 消化酶：来自 *Bacillus polymyxa* 的中性蛋白酶。在添加 10mmol/L HEPES 的 Williams 溶液 E 中加链霉蛋白酶至 100U/mL，混匀，pH7.4。

(7) Accutase：3mL/75cm^2 烧瓶(PAA Laboratory)。

(8) 培养液：在 Williams 溶液 E 中添加 10%新生小牛血清、2mmol/L *L*-谷氨酰胺、50U/mL 青霉素和 50μg/mL 链霉素。

55 (9) 冷冻液：在 Williams 溶液 E 中补充 2mmol/L *L*-谷氨酰胺、15%(*V*/*V*)胎牛血清、10%(*V*/*V*)二甲基亚砜(DMSO)、50U/mL 青霉素和 50μg/mL 链霉素。

(10) 70%(*V*/*V*)乙醇。

(11) CO_2 培养箱。

(12) 离心机。

(13) 振动水浴。

(14) 倒置光学显微镜。

(15) 无菌解剖刀。

(16) 尼龙筛(孔径 250μm 和 100μm)。

(17) 血细胞计数器。

(18) 克隆环(内径 5mm、外径 13mm、高 8mm)。

(19) 硅润滑油。

(20) 组织培养塑料制品：消毒的吸管、培养瓶、皮氏(Petri)培养皿。

3 方法

3.1 从新生大鼠肝脏中分离细胞

(1) 从 10d 龄大鼠体内取出肝脏[见注意事项(1)]，放入 35mm 皮氏培养皿内。

(2) 加入 2mL Hank 溶液。

(3) 用解剖刀切碎大鼠肝脏，使每块体积小于 1mm^3[见注意事项(2)]。

(4) 将切碎的材料转移到锥形瓶中，加入 8mL 无血清 Williams 溶液 E 和 10mL 0.2% 胰蛋白酶溶液。

(5) 在 37℃温度下，振动水浴培养。

(6) 10min 后，让组织碎片沉淀 1~2min。

(7) 用吸管吸取 15mL 上清液，200*g* 离心 3min。

(8) 离心分离后，把含有胰蛋白酶的上清液重新移入锥形瓶，然后至少培养 10min[重复步骤(6)~(9)，见注意事项(3)]。

(9) 在 5mL 培养液中重悬离心所得沉淀[见注意事项(4)]，把悬浮所得细胞转移到培养瓶(如 2.5mL/50mL 培养瓶)。

(10) 轻轻地摇动培养瓶，确保细胞均匀分布，然后置于 CO_2 浓度为 5%，温度为 37℃ 的加湿培养箱中培养。

(11) 2d 后，更换培养液[见注意事项(5)]。

(12) 每天使用相差显微镜检查上皮细胞克隆的生长情况。不要让细胞在培养瓶内形成铺满的细胞单层[见注意事项(6)]。

(13) 选择上皮细胞克隆数量最多的培养瓶，吸出瓶内的培养液。

(14) 在培养瓶中加入 2mL 0.2%胰蛋白酶，室温下放置 2min。除去大部分液体，仅在细胞表面留下一薄层胰蛋白酶液体。

(15) 在相差显微镜下观察培养的细胞。如果上皮细胞开始缩小并变圆，加入 5mL 含有 10% 新生牛血清的培养液[见注意事项(7)]。

56

(16) 轻轻地摇动培养瓶，使上皮细胞脱离培养瓶[见注意事项(8)]。

(17) 把上述细胞从一个培养瓶中移到两个新培养瓶中。轻轻地摇动培养瓶，确保细胞均匀分布。

(18) 在温度为 37℃、5% CO_2 的加湿培养箱中培养。

(19) 每隔一天，更换培养液[见注意事项(5)]。

(20) 在细胞铺满前重复步骤(4)~(6)。至此，可以进行上皮细胞的克隆(见 3.3)。

3.2 从成年大鼠肝脏中分离细胞

(1) 准备肝脏细胞一般包括两个通常的分离步骤：分别用不含钙的灌注液和含有高钙胶原酶的灌注液灌注肝脏。

(2) 用胶原酶灌注 15~20min 后，用消化酶灌注肝脏 4min，每分钟灌注 20mL[见注意事项(9)]。

(3) 停止灌注，将肝脏移到一个盛有 50mL 分离液的烧杯。

(4) 用剪刀将肝脏多次穿孔，但不使肝叶分离。

(5) 用镊子夹住肝静脉的剩余部分，在分离液中轻轻摇动组织，以便释放肝脏细胞[见注意事项(10)]。

(6) 通过双层纱布过滤细胞悬液，除去未分散的组织和较大的细胞团块。

(7) 重复过滤，首先通过孔径为 250μm 的尼龙筛，然后通过孔径为 100μm 的尼龙筛。

(8) 过滤细胞悬液之后，在 50*g* 离心 5min，然后弃掉沉淀[见注意事项(11)]。

(9) 上清液在 100*g* 离心 5min，然后弃掉上清液。

(10) 在分离液中重新悬浮沉淀细胞。重复步骤(9)、(10)共 3 次。

(11) 最后在培养液中重悬沉淀细胞并计数。

(12) 在 50mL 培养瓶中培养细胞。每个培养瓶大约培养 0.6×10^6 个细胞[见注意事项(12)]。

(13) 每隔一天，更换培养液[见注意事项(5)]。

(14) 每天使用相差显微镜检查上皮细胞克隆的生长情况。不要让细胞在培养瓶内形成细胞单层[见注意事项(13)]。

(15) 选择上皮细胞克隆数量最多的培养瓶，吸出瓶内的培养液。

57

(16) 在培养瓶中加入 2mL 含有 0.2%胰蛋白酶的 Hank 溶液，室温下放置 2min。除去大部分液体，仅在细胞表面留下一薄层胰蛋白酶液体。

(17) 在相差显微镜下观察培养的细胞[见注意事项(14)]。当上皮细胞缩小变圆时，加入 5mL 含有 10%新生小牛血清的培养液[见注意事项(15)]。

(18) 轻轻地摇动培养瓶，使上皮细胞脱离培养瓶[见注意事项(8)]。

(19) 把上述细胞从一个培养瓶中移到两个新培养瓶中。轻轻地摇动培养瓶，确保细胞均匀分布。

(20) 在温度为 37℃、CO_2 浓度为 5%的加湿培养箱中培养。每隔一天，更换培养液[见注意事项(5)]。

(21) 在细胞铺满之前，重复步骤(16)~(18)。至此，可以进行下一步的克隆。

3.3 肝脏上皮细胞的克隆

(1) 使用克隆环技术克隆细胞[见注意事项(16)]。同前，首先用胰蛋白酶分离基底层中的细胞。

(2) 用培养液稀释上述细胞悬液，使其浓度分别为每毫升 5 个、10 个和 20 个细胞。

(3) 在 90mm 的皮氏培养皿中接种细胞，使其密度分别为每平方厘米 0.5 个、1 个和 2 个细胞[见注意事项(17)]。

(4) 在 37℃、CO_2 培养箱中培养数日，直到小的克隆形成。

(5) 用消毒的镊子夹住克隆环，将其底部浸在硅润滑油中。然后将克隆环压在消毒的皮氏培养皿上，确保整个克隆环的底部被一薄层硅润滑油所覆盖。

(6) 检查皮氏培养皿寻找合适的细胞克隆。这些细胞克隆的直径应为 1~3mm，并足以从邻近的细胞克隆(>1cm)分离出来。

(7) 在培养皿的下面用记号笔标记你想分离的适当的细胞克隆，每个培养皿中最多标记 3 个克隆并被挑选。

(8) 除去培养皿中的液体。

(9) 把克隆环放置在挑选的细胞克隆周围[见注意事项(18)]。确保克隆环紧贴细胞克隆。

(10) 加入 0.4mL 含有 0.2%胰蛋白酶的培养液，保存 30s，然后弃掉。

(11) 盖上培养皿，放入培养箱中 5~10min。当细胞浮起时，注意检查。

(12) 每个环中加入 0.5mL 培养液。

(13) 为了挑取克隆，用吸管上下吹打液体，使细胞分散。移入 $25cm^2$ 培养瓶中[见注意事项(19)]。注意：挑取一个克隆使用一个分离吸管。

(14) 用 0.5mL 培养液漂洗克隆环一次，将培养液也移入同一培养瓶。

(15) 每个培养瓶中另加入 1mL 培养液，然后在 37℃、CO_2 培养箱中培养。

(16) 当细胞长到铺满时，用胰蛋白酶使其分离然后传代培养[见注意事项(20)]。

3.4 培养

58

(1) 将上皮细胞用培养液持续培养，每隔 3d 更换一次培养液[见注意事项(5)]，直到细胞铺满为止(图 6.1)。

(2) 接近铺满或已经铺满的培养细胞可以传代。

(3) 除去培养液，然后加入 2mL(50mL 培养瓶)无钙 Hank 溶液[见注意事项(22)]。

(4) 3min 后，用 2mL 含有 0.2%胰蛋白酶的溶液替换无钙 Hank 溶液[见注意事项(23)]。

(5) 在相差显微镜下观察培养细胞。如果细胞开始缩小、变圆，细胞单层解体，加入含有 10%新生小牛血清的培养液。

(6) 轻轻摇动培养瓶，使细胞脱离培养瓶壁[见注意事项(8)]。

(7) 把细胞悬液移入离心管中，150*g* 离心 5min。

(8) 除去上清液，在普通培养液中轻轻地再悬浮细胞，使细胞浓度为 1×10^5~3×10^5 个/mL。

(9) 将细胞移入新培养瓶中培养，浓度为 13×10^3~40×10^3 个/cm^2(10mL/75cm^2 培养瓶)[见注意事项(24)]。轻轻摇动培养瓶，以使细胞分布均匀。

(10) 在温度为 37℃、湿度饱和的 CO_2 培养箱中培养，避免干扰。

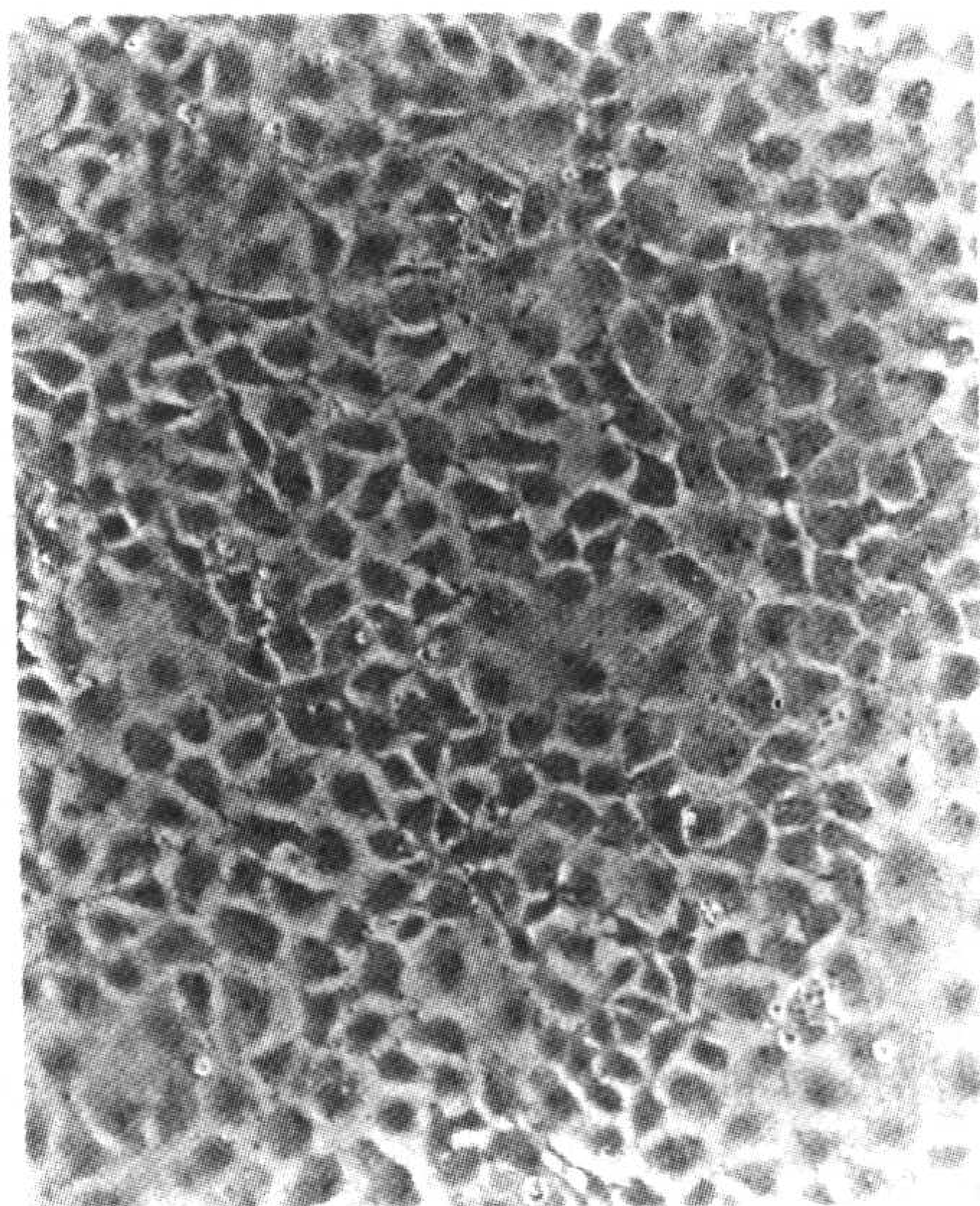


图 6.1 大鼠肝脏上皮细胞铺满单层时的(line RL-ET-14[6])相差显微照片(40×)

3.5 肝脏上皮细胞的保存

59

3.5.1 冷冻和储存

(1) 选择未铺满且处于指数生长期的细胞用于冻存[见注意事项(25)]。

(2) 用 0.2%胰蛋白酶将细胞分离。

(3) 加入培养液，100*g* 离心 5min。

(4) 在冷冻液中悬浮细胞，使其浓度达到 10^6 个/mL[见注意事项(26)]。

(5) 把细胞悬液(1mL)放置在小的冻存管中，密封。

(6) 室温下放置 20min。

(7) 将冻存管放入含有隔热药棉的聚苯乙烯泡沫盒，然后将泡沫盒放入冰箱中(−80℃)，让温度缓慢地降低(大约−1℃/min)[见注意事项(27)]。

(8) 12h 后，将冷冻管转移至液氮中[见注意事项(28)]。

3.5.2 解冻

(1) 从液氮中取出冷冻管。

(2) 将冷冻管迅速地放进一个桶内，桶内至少含有 1L 37℃的水[见注意事项(29)]。

(3) 在桶中轻轻地旋转冻存管，以便使其尽快解冻。

(4) 当其解冻后，用 70%乙醇擦洗冻存管。在无菌橱中打开冻存管。

(5) 将内存细胞转移至一个 25cm^2 培养瓶中[见注意事项(30)]。

(6) 加入 1mL 培养液，并在温度为 37℃、CO_2 培养箱中培养。

(7) 当细胞处于指数生长状态时，进行传代培养。

4 注意事项

(1) 按照伦理标准和特定国家关爱动物的规定饲养和处理大鼠(成年鼠或幼鼠)。在进行肝脏切除时，用二乙醚对动物进行麻醉或直接断颈处死，一切都要符合伦理要求。最重要的是用消毒剂对动物进行消毒，同时对进行肝脏切除的实验用具进行消毒。

(2) 可以借助组织切片机将肝脏组织制成切片(50~100μm)。

(3) 每次传代培养得到 2 瓶细胞。由于来自肝脏组织的上皮细胞每次都不相同，因此最好进行 8~10 次培养，并且仔细标记培养瓶。通常，最好的细胞是 2~4 代培养产生的细胞，但有时在以后的几代培养中也能得到很好的上皮细胞。比较之后，选择最好的细胞。

(4) 培养液需添加抗生素，如青霉素(50U/mL)和链霉素(50μg/mL)。我们建议，对于细胞无菌培养技术方面经验较少的实验室，从第一步开始，就要加入这两种抗生素，直到建立稳定的细胞系。应当注意，加入抗生素不能替代严格无菌操作，如果忽略此步骤，可能会增加丢失细胞系的可能性。

60

(5) 对于新获得的或克隆的上皮细胞，每 2 天或 3 天更换一次培养液即可。但如果培养液的颜色变成橘黄色或黄色，应当立即更换。

(6) 因为最初的培养物中，细胞的组成很不一致，让细胞铺满可能导致所需细胞的漂浮或其他不利因素，尤其是阻碍细胞单层的分离。因此，建议在细胞未完全铺满时即重新分散细胞。

(7) 应当仔细观察上皮细胞的行为。其他类型的细胞可能比上皮细胞分离得更早或更晚些。如果选择适当的分离次数，利用这些特征可以进一步分离上皮细胞。

(8) 简单地摇动培养瓶有时不容易将上皮细胞分离。在这种情况下，可以用一个吸管吸取液体将上皮细胞平稳地冲洗下来。

(9) 消化酶(中性蛋白酶)比链霉蛋白酶更好。

(10) 同样地，也可以综合使用其他方法分散细胞[21]。

(11) 虽然通常肝脏实质细胞活力较高，但因为它们的特性与单独使用胶原酶分离的细胞不同，所以建议不将它们用于培养。

(12) 由于混杂有不同数量的肝脏实质细胞和其他类型细胞，所以会造成接种密度的不同。理想情况下，接种细胞应当覆盖培养区域的 1/3~1/2。

(13) 在铺满培养时，由于受邻近肝脏实质细胞的影响，整个培养物铺满后可能造成上皮细胞难于分离。

(14) 由于成年大鼠肝脏的上皮细胞不像新生大鼠肝脏的上皮细胞那样容易分离，所以成年大鼠肝脏上皮细胞应在 37℃左右温度下消化。

(15) 通常，肝脏实质细胞较肝脏上皮细胞更易分离和遭到破坏。如果仍然有许多残存肝脏实质细胞，可首先用无血清的 William 溶液 E 冲洗，除去肝脏实质细胞，然后加

入胰蛋白酶继续消化。

(16) 同样地，稀释克隆技术也可参照注意事项(22)进行。

(17) 要确保能得到最佳的稀疏培养密度，至少使用 3 种不同浓度的细胞(大于 1 个/cm^2、小于 1 个/cm^2 和等于 1 个/cm^2)。注意稀疏培养后细胞的生长效率更低，生长更加缓慢。

(18) 确保克隆位于克隆环的中央。如果克隆太大，克隆环可能会放到一些细胞的上面。然而考虑到大的克隆通常是从多个细胞得到的，所以这不是单克隆。

(19) 有时在 24 孔培养板中培养细胞更好，而且为了促进其生长不可过度稀释。同时确保在细胞铺满前传代。

(20) 通常情况下，至少需要进行 2 次克隆才可能得到单克隆来源的细胞。

61

(21) 细胞铺满后通常会造成表型的改变：细胞外基质数量增加，细胞生长能力下降，并可能会表现休眠的特征。因此，我们强烈建议在细胞铺满之前进行细胞传代，并且在相同的发育状态下每次要分 2 份培养细胞。

(22) 无钙 Hank 溶液不是必需的，正常的 Hank 溶液可以满足许多细胞系预孵育的需要。而对另一些细胞而言，加入 EDTA(0.37g/L)与胰蛋白酶一同消化可以缩短消化时间。因此，对于每种不同的细胞系而言，需分别选择最佳的预孵育条件。

(23) 为了建立细胞克隆，在分离细胞时 Accutase 可以成功地替换胰蛋白酶。事实上，Accutase 对细胞产生的损伤可能比胰蛋白酶要小(观察结果，未发表)。

(24) 如果这些细胞的表现型稳定，可以不做细胞计数而直接进行细胞传代。而且在这种情况下，细胞可以从 1 瓶传代至 3~8 瓶。

(25) 细胞解冻之后，只有处于指数生长期的细胞才有较高的存活率和增殖能力。

(26) DMSO 溶解力极强而且十分危险，使用时要特别小心。

(27) 利用一台程序化的冷冻仪(价格昂贵)可控制冷却速度。

(28) 细胞一般可以储存几年。但是储存期间如果温度变化较大，则可能引起细胞活力的大幅度降低。因此，至少每 2 年检查一次细胞的活力和增殖情况，以免丢失细胞系。

(29) 如果在液体状态下保存样品，由于瓶子有爆炸的危险，因此应当用盖子遮盖装样品的桶。

(30) 一些细胞系不能耐受 DMSO，在这种情况下，细胞悬液应当在 100*g* 离心，细胞团块用 1mL 培养液重悬。

(赵田夫 译　周家喜 校)

参 考 文 献

[1] Gerschenson, L. E., Anderson, M., Molson, J., and Okigaki, T. (1970) Tyrosine transaminase induction by dexamethasone in a new rat liver cell line. *Science* **170**, 859-861.

[2] Borek, E. (1972) Neoplastic transformation *in vitro* of a clone of adult liver epithelial cells into differentiated hepatoma-like cells under conditions of nutritional stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **69**, 956-959.

[3] Williams, G. M., Weissburger, E. L., and Weissburger, J. H. (1971) Isolation and long-term culture of epithelial-like cells from rat liver. *Exp. Cell Res.* **69**, 106-112.

[4] Grisham, J. W. (1983) Cell types in rat liver: their identification and isolation. *Mol. Cell. Biochem.* **53**, 23-33.

[5] Marceau, N., Germain, L., Goyette, R., Noel, M., and Gourdeau, H. (1986) Cell of origin of distinct cultured rat liver epithelial cells, as typed by cytokeratin and surface component selective expression. *Biochem. Cell Biol.* **64**, 788-802.

62 [6] Gebhardt, R., Schrode, W., and Eisenmann-Tappe, I. (1998) Cellular characteristics of epithelial cell lines from juvenile rat liver: selective induction of glutamine synthetase by dexamethasone. *Cell Biol. Toxicol.* **14**, 55-67.

[7] Gebhardt, R., and Jonitza, D. (1991) Different proliferative response of periportal and perivenous hepatocytes to EGF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **181**, 1201-1207.

[8] Eisenmann-Tappe, I., Wizigmann, S., and Gebhardt, R. (1991) Glutamate uptake in primary cultures of biliary epithelial cells from normal rat liver. *Cell Biol. Toxicol.* **7**, 315-325.

[9] Joplin, R., Hishida, T., Tsubouchi, H., Daikuhara, Y., Ayres, R., Neuberger, J. M., and Strain, A. J. (1992) Human intrahepatic biliary epithelial cells proliferate *in vitro* in response to human hepatocyte growth factor. *J. Clin. Invest.* **90**, 1284-1289.

[10] Sirica, A. E., Mathis, G. A., Sano, N., and Elmore, L. W. (1990) Isolation, culture, and transplantation of intrahepatic biliary epithelial cells and oval cells. *Pathobiology* **58**, 44-64.

[11] Tsao, M.-S., Smith, J. D., Nelson, K. G., and Grisham, J. W. (1984) A diploid epithelial cell line from normal adult rat liver with phenotypic properties of oval cells. *Exp. Cell Res.* **154**, 38-52.

[12] Grisham, J. W., Thal, S. B., and Nagel, A. (1975) Cellular derivation of continuously cultured epithelial cells from normal rat liver, p. 1-23. In, *Gene expression and carcinogenesis in cultured liver* (Gerschenson, L. E. and Thompson, E. B., eds.). Academic Press, New York.

[13] Gebhardt, R. and Williams, G. M. (1986) Amino acid transport in established adult rat liver epithelial cell lines. *Cell Biol. Toxicol.* **2**, 9-20.

[14] Kässner, G., Neupert, G., Scheibe, R., and Wenzel, K.-W. (1991) Isoenzymes of pyruvate kinase, lactate dehydrogenase and alkaline phosphatase in epithelial cell lines of rat liver. *Exp. Pathol.* **43**, 51-56.

[15] Neupert, G., Langbein, L., and Karsten, U. (1987) Characterization of established epitheloid cell lines derived from rat liver: expression of cytokeratin filaments. *Exp. Pathol.* **31**, 161-167.

[16] Tsao, M. S. and Grisham, J. W. (1987) Hepatocarcinomas, cholangiocarcinomas, and hepatoblastomas produced by chemically transformed cultured rat liver epithelial cells. *Am. J. Pathol.* **127**, 168-181.

[17] Mayer, D. and Schäfer, B. (1982) Biochemical and morphological characterization of glycogen-storing epithelial liver cell lines. *Exp. Cell Res.* **138**, 1-14.

[18] Lazaro, C. A., Rhim, J. A., Yamada, Y., and Fausto, N. (1998) Generation of hepatocytes from oval cell precursors in culture. *Cancer Res.* **58**, 5514-5522.

[19] Braun, L., Mikumo, R., and Fausto, N. (1989) Production of hepatocellular carcinoma by oval cells: cell cycle expression of c-myc and p53 at different stages of oval cell transformation. *Cancer Res.* **49**, 1554-1561.

[20] Williams, G. M. (1976) Primary and long-term culture of adult rat liver epithelial cells. *Methods Cell Biol.* **14**, 357-364.

63 [21] Furukawa, K., Shimada, T., England, P., Mochizuki, Y., and Williams, G. M. (1987) Enrichment and characterization of clonogenic epithelial cells from adult rat liver and initiation of epithelial cell strains. *In Vitro Cell. Develop. Biol.* **23**, 339-348.

[22] Freshney, I. (1987) *Culture of animal cells. A manual of basic technique*. 2nd ed. Alan R. Liss, New York.

第 7 章 肺上皮细胞的培养

65

Ben Forbes

1 引言

1.1 背景

当导气管逐渐向肺泡区延伸时，呼吸系统上皮的细胞成分发生很大变化。本章重点探讨构成肺外周气体交换(肺呼吸)区的单层上皮细胞的培养。肺上皮由 I 型和 II 型肺泡上皮细胞构成，其比例为 1∶2。虽然 II 型与 I 型肺泡细胞是根据它们的部分正常生理替换或修补机制不同而区分的，但这两种细胞类型(也称为肺细胞)在功能和形态学上明显不同(表 7.1)。II 型肺泡细胞虽然在数目上比 I 型肺泡细胞要多，即使将顶部微绒毛计算在内，其所占上皮表面面积的比例也不到 10%。II 型细胞为立方形，从它们含有的片层体(lamellar body)可以辨别出来，对这些细胞来说，片层体是独特的结构[1]。I 型肺泡细胞呈鳞片状，含有少量的线粒体或细胞内含物，构成 90%以上的上皮表面[2]。

表 7.1 人类 II 型与 I 型肺泡细胞的特征

项别	II 型细胞	I 型细胞
描述	立方形，含明显的片层体和大量胞质内含物	鳞片状细胞，具有延伸状的胞质和少量的胞质内含物
近似值	体积：900μm^3	体积：1800μm^3
尺寸[a]	表面积：200μm^2 周长：50μm 厚度：1μm	表面积：5100μm^2 周长：250μm 厚度：0.1μm
功能	激活离子和水的转运产生肺泡表面的活性剂 I 型细胞的祖先	提供血液-空气气体交换薄层的区域界面

[a] 大鼠 I 型与 II 型细胞小于人类的细胞[1,2]。

虽然永生化细胞系不断涌现，它们代表了不同类型的支气管上皮[3]，但没有任何细胞系能够具有理想的肺泡上皮细胞的特征。所以，原代培养就为大多数需要肺泡上皮细胞的研究应用提供了细胞来源。肺泡上皮细胞的原代培养包括来源于实验动物肺细胞的分离、纯化和培养。相似的方法已被用来分离和培养人类肺泡上皮细胞[4]，但人类组织的缺乏性阻碍了人类细胞的常规应用。

66

以前对 I 型细胞的分离曾做过尝试[2]，但其方法却很少有所改进，其结果也未能进行有效描述。相反，在最近的 25 年内，II 型细胞的分离和培养却得到了长足进展[5~13]。分离后的 II 型细胞应在 48h 之内进行研究，使其在代谢上、功能上和毒理学上的反应得以维持。另外，应用 Kim 及其同事[5,6]首次报道的方法培养 II 型细胞，可产生类 I 型肺泡细胞单层，此单层代表肺泡上皮的通透性屏障。在此描述这种方法的目的在于，产生紧密的类 I 型肺泡细胞单层，此单层具有跨上皮的高电阻，适合用来研究肺泡的通透性

和药物转运[7]。

从实验大鼠分离 II 型肺泡细胞，是有关这些细胞最普遍的来源。自 1974 年分离 II 型细胞的方法首次报道以来[8]，许多有关从肺分离 II 型上皮细胞，以及从混合的粗细胞悬液中纯化 II 型肺泡上皮细胞的方法得到了发展[9,10]。文中描述的方法是建立在良好技术的基础上的，同样在注意事项中也提到了一些改进了的替代方法。完整肺的外科分离和细胞的酶裂解，要求进行一些练习来掌握快速有效的技术，这对最终分离细胞的质量至关重要。一旦得到 II 型肺泡细胞，几乎不发生增殖，但可以通过调节细胞培养条件以维持 II 型细胞的表现型，或者促进类 I 型细胞单层的形成。

67

1.1.1 II 型肺泡细胞的分离

此分离步骤的目的在于得到大量的活细胞，同时把非 II 型细胞的量降到最低。第一步是外科分离肺以及对肺循环进行灌注以弃掉血细胞。用灌洗的方法从肺气腔中弃掉非上皮细胞。在健康动物中这些细胞主要是巨噬细胞。从外周肺的血管和气腔中弃掉游离的细胞以后，把蛋白质水解酶溶液输入肺，从而从基膜上裂解出肺上皮细胞。所用酶液的成分对获得细胞悬液的质量非常重要[见注意事项(1)]。应用弹性蛋白酶比胰蛋白酶对细胞造成的伤害要小。弹性蛋白酶已被多数研究者所接受和选用。

1.1.2 II 型肺泡细胞的纯化

从粗细胞悬液中分离 II 型细胞的方法是利用不连续 Percoll 梯度离心，然后差异黏附于皮氏培养皿(图 7.1)。这种方法是根据大小和密度来选择 II 型细胞的，然后在皮氏培养皿中短暂孵育来进一步弃掉污染的细胞(大多数是巨噬细胞)。这些巨噬细胞比 II 型细胞更容易黏附于培养皿上。应用 IgG 包被的培养皿弃掉巨噬细胞和白细胞，是从粗细胞悬液中纯化的主要替代方法[见注意事项(2)]。

应该对分离和纯化过程进行常规检查，包括获得细胞的数量(产量)、II 型细胞的比例(纯度)以及细胞的健康状况(活力)。鉴定 II 型细胞的一个简单方法是，应用巴氏(Papanicolaou)法对其片层体特有的表面活性磷脂进行染色[9]。确定 II 型表现型的其他方法包括外源凝集素结合、胞外酶表达或活力、电子显微镜观察。有关 II 型细胞分离、纯化和特征描述的不同方法的相对优点已有人做过综述[9,10]。

1.1.3 类 I 型肺泡细胞表型的培养

如果 II 型肺泡细胞的特征要保持 48h 以上，就必须防止培养的 II 型肺泡细胞去分化的趋势。通过调整培养基的成分和培养条件，就可以延长 II 型细胞表现型的表达和保持这些细胞立方形的形态[9]。否则，培养时类 I 型细胞几乎立即就开始形成，经过 4~6d，这些细胞就变得酷似 I 型细胞。当在通透性细胞培养载体上培养时(图 7.2)，细胞呈现 I 型细胞的形态和许多生物化学性质。尽管越来越多的证据表明这些细胞获得了 I 型细胞的表现型，但多数研究者仍然谨慎地把这些培养称之为类 I 型细胞。紧密单层(具有高跨上皮电阻的单层)的形成主要依赖于分离细胞的试剂、细胞接种密度、细胞培养基以及培养时间[6,7]。

68 69

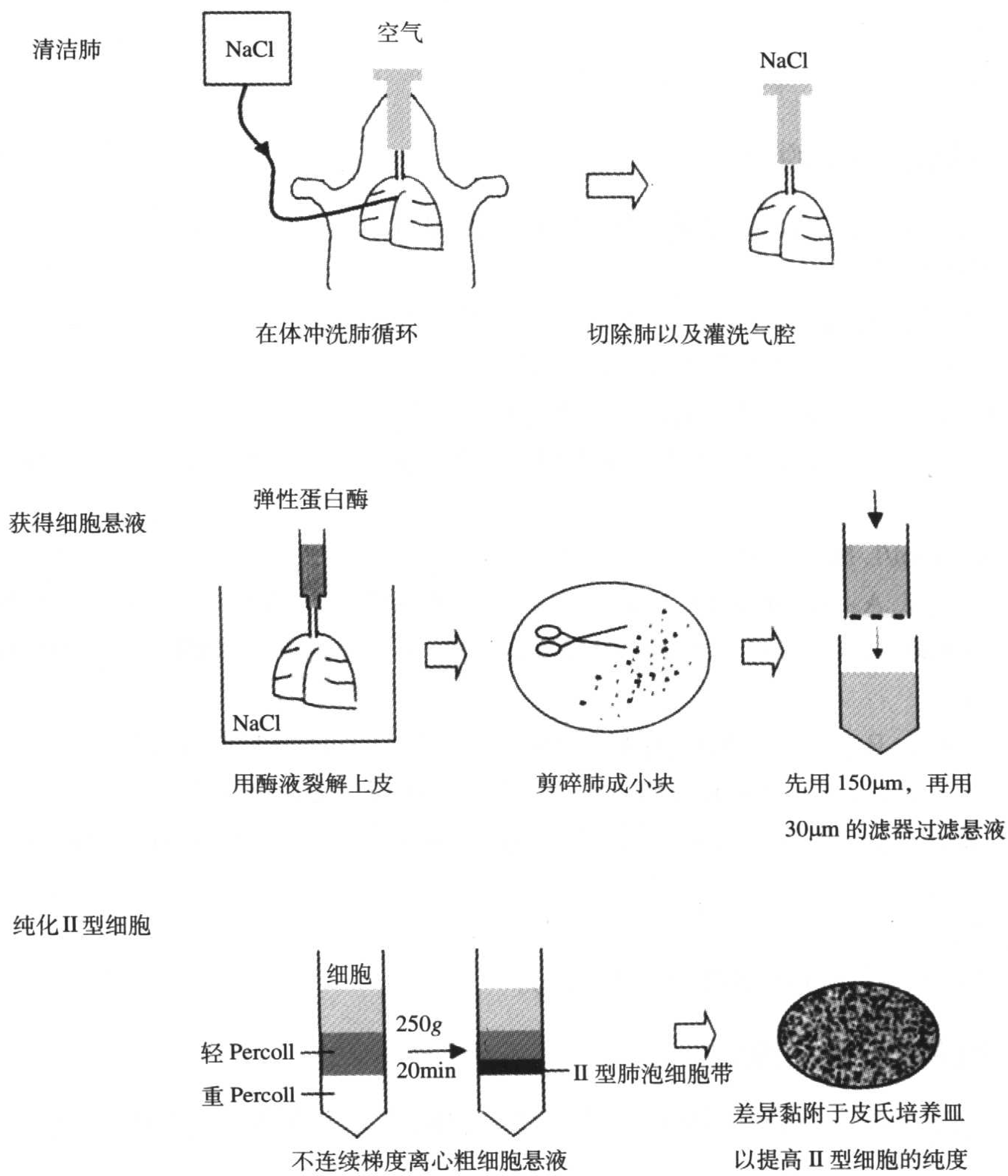


图 7.1　II 型肺泡细胞分离的主要步骤示意图

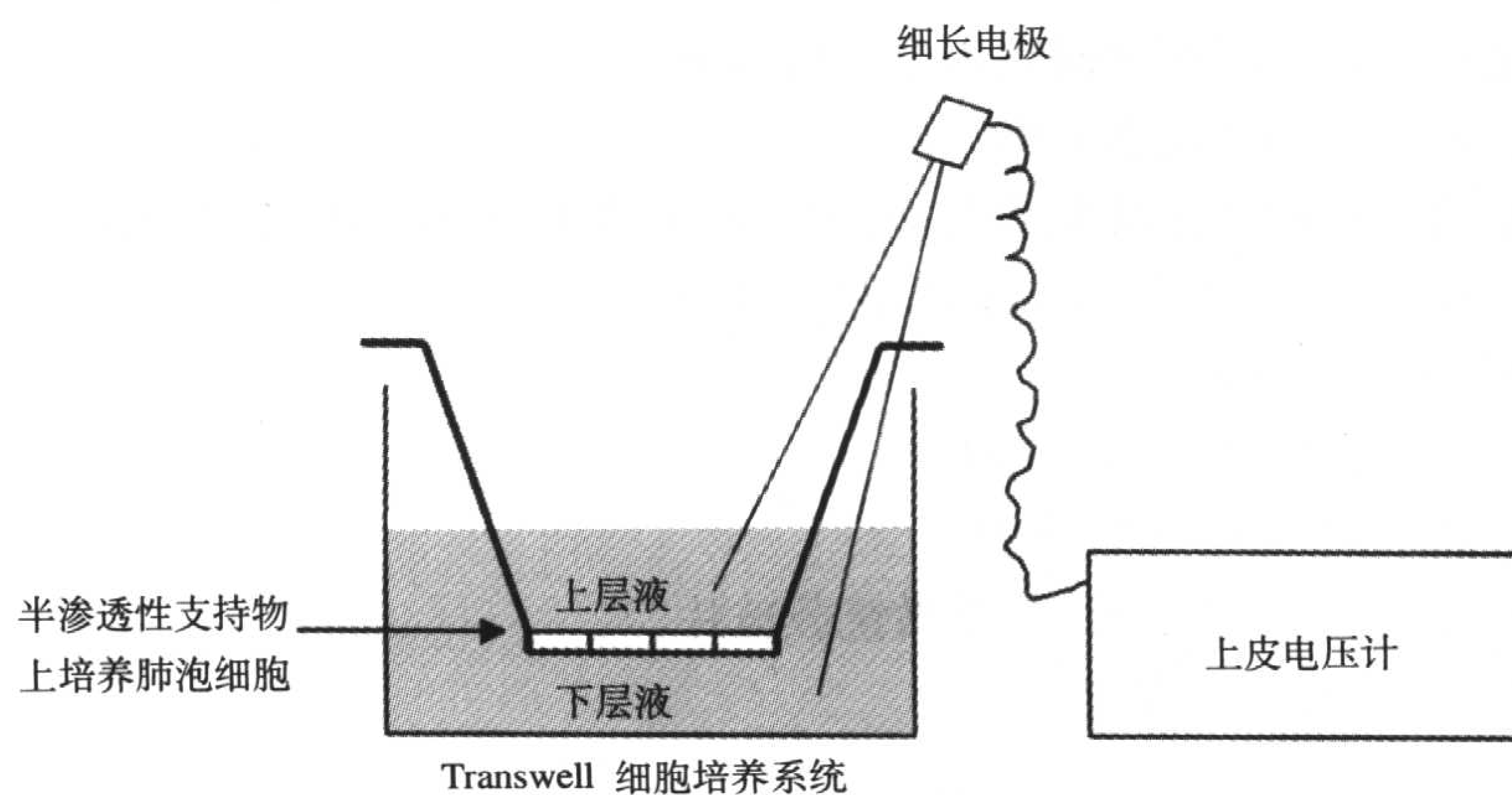


图 7.2　Transwell 细胞培养系统和应用细长电极测压计测量跨上皮电阻，类 I 型肺泡上皮细胞的培养示意图

2　材料

2.1　II 型肺泡细胞的分离

(1) 无感染大鼠，体重 150~250g[见注意事项(3)]。

(2) 苯巴比妥。

(3) 解剖器械，包括弯剪刀，用来把肺剪成小组织块。

(4) 用来灌洗和注射消化培养基的注射器。

(5) Luer 锁钝特氟纶(聚四氟乙烯)套管和缝合线。

(6) 用作肺循环灌注液[见注意事项(4)]和灌洗液[见注意事项(5)]的 0.15mol/L NaCl (灭菌)。

(7) 0.15mol/L NaCl (灭菌)。

(8) 缓冲液 A：133mmol/L NaCl，5.2 mmol/L KCl，1.89mmol/L $CaCl_2$，1.29mmol/L $MgSO_4$，1mmol/L NaH_2PO_4，6mmol/L Na_2HPO_4，10.3mmol/L HEPES，5.6mmol/L 葡萄糖，pH 7.4。

(9) 缓冲液 B(无 Ca^{2+}、Mg^{2+})：133mmol/L NaCl，5.2mmol/L KCl，1mmol/L NaH_2PO_4，6mmol/L Na_2HPO_4，10.3mmol/L HEPES，5.6mmol/L 葡萄糖，pH 7.4。

(10) 酶液[见注意事项(6)]：弹性蛋白酶 2U/mL(Worthington Biochemical)溶于缓冲液 A。

(11) 胎牛血清(FBS)。

(12) IV 型脱氧核糖核酸酶 I (DNase I)。

2.2　II 型肺泡细胞的纯化

(1) 重 Percoll 液：6.5mL Percoll，0.05mL FBS，2.5mL 蒸馏水，0.95mL 缓冲液 A(见 2.1)。

70

(2) 轻 Percoll 液：2.7mL Percoll，0.05mL FBS，6.3mL 蒸馏水，0.95mL 缓冲液 A(见 2.1)，一滴酚红。

(3) 灭菌离心管，细菌学研究用皮氏培养皿。

(4) 无振动转子的冷冻离心机。

(5) 细胞培养基：DMEM 培养基中添加 10% FBS，8 mmol/L 谷氨酰胺，100U/mL 青霉素，50μg/mL 庆大霉素，0.1μmol/L 地塞米松。

(6) 0.4% 台盼蓝(*m*/*V*)。

(7) Harris 血毒素(Hemotoxylin)。

(8) 碳酸锂溶液[见注意事项(7)]。

(9) 相差显微镜，血细胞计，显微镜载玻片。

(10) 二甲苯，乙醇，蒸馏水。

2.3　类 I 型肺泡细胞表型的培养

(1) 按细胞培养要求处理的聚碳酸酯细胞培养载体，孔径 0.4μm[Transwell®系统

(Costar 公司)或者相当的物品]。其他按照实验要求可能用到的细胞培养塑料制品。

(2) 细胞培养基：见 2.2。

(3) CO_2 细胞培养箱。

(4) Evom 上皮电压测量计。

3 方法

3.1 II 型肺泡细胞的分离

(1) 用苯巴比妥致死量腹部皮下注射麻醉大鼠。

(2) 使大鼠仰卧，暴露出气管，小心地把气管垂直切为两半，但不要完全分离[见注意事项(8)]。

(3) 插入气管套管到气管中大约 1.5cm 深，停留在气管分岔处到支气管这一段的上方。

(4) 用缝合线扎住套管，用注射器使肺部分充气($1cm^3$)。

(5) 沿腹中线做切口打开腹腔，切断腹主动脉，除去大鼠的血液。

(6) 剪掉横膈膜，暴露胸腔，截去胸骨，小心折断肋骨，摘除胸腺，最大限度地扩大至肺的通路[见注意事项(9)]。

(7) 在右心室基部做切口，插入一个套管(慢慢使灌注液渗入)到肺动脉。

(8) 沿动脉向上推动套管，直到套管到达心脏的顶部。

(9) 右心房很快会鼓起，应马上切开让液体从肺循环中流出来。

(10) 利用重力输送(高于大鼠 30~50cm 的位置)灭菌的 0.15mol/L NaCl 灌入肺循环。同时用 $1cm^3$ 的空气向肺充气 10 次，使肺迅速、均一地发白直到完全呈现白色。

(11) 用气管套管抬高肺，用剪刀使它们脱离胸腔，然后用套管上悬挂器官。

71

(12) 把一个 20mL 的注射器连接到气管套管的开口，向肺注入 8mL 0.15mol/L NaCl，把注射器从气管套管上取掉，使灌洗液从肺流出。重复此过程至少 6 次，尽可能地除去巨噬细胞。

(13) 向肺灌入 10mL 过滤除菌的酶液，悬浮在 37℃盛有 0.15mol/L NaCl 的烧杯中。使用含有 80U 弹性蛋白酶的总量为 40mL 的酶液[见注意事项(10)]，在上部加酶液超过 20min。

(14) 把肺转移到一个皮氏培养皿中，剪掉气管和主要的支气管，然后用弯曲的剪刀把肺实质剪成 $1\text{~}2cm^2$ 的小组织块。

(15) 加入 5mL FBS 终止消化，然后加入 15mL 含有 0.025%(*m*/*V*)DNA 酶的缓冲液 B 防止细胞聚合。把悬浮液转移到一个 50mL 的离心管中，37℃水浴中振荡 4min。

(16) 用逐渐缩小直径的滤膜(孔径 150μm 的纱布和 30μm 的尼龙膜)过滤悬液。此细胞悬液是肺泡细胞分离粗悬液。

3.2 II 型肺泡细胞的纯化

II 型肺泡细胞的纯化过程[见注意事项(11)]：

(1) 把粗细胞悬液平铺于灭菌的不连续 Percoll 梯度的顶部[见注意事项(12)]。Percoll

梯度应该这样准备：50mL 离心管中加入 10mL 重 Percoll 溶液(1.089g/mL)，上面平铺有 10mL 轻 Percoll 溶液(1.040 g/mL)[见注意事项(13)]。

(2) 用非振动转头 4℃、250*g* 离心 20min，在 Percoll 梯度之间产生一个 II 型肺泡细胞丰富的层[见注意事项(14)]。

(3) 用一个巴氏吸管转移 II 型肺泡细胞丰富的层至一个新离心管中。用 40mL 冰冷的含有 0.005% DNA 酶的缓冲液 B 洗细胞，4℃、250*g* 离心 20min，使 II 型细胞呈团块状。

(4) 在 10mL 细胞培养基中重新悬浮 II 型细胞团块，转移至一个皮氏培养皿中培养 90min(37℃、95%空气和 5%CO_2)。轻轻来回摇动细胞以收集 II 型细胞，但要留下黏附的细胞。

(5) 细胞悬液应经过简单的计数[见注意事项(15)]、活力测定和巴氏染色。细胞在培养基(见 3.3)中重新悬浮前，细胞悬液应离心(250*g*、20min)。

(6) 向 400μL 细胞悬液中加入 100μL 台盼蓝 10~15min 后可以测定细胞的活力。健康细胞排斥染料而受损细胞吸收染料，这样就可以对细胞进行差异计数，其活力用排斥染料的细胞的比例(%)表示[见注意事项(16)]。

(7) 用 Dobbs 描述的改进的巴氏染色法能很容易地把 II 型细胞鉴别出来[9]。至于监测纯度的方法，推荐在纯化每一步之前和之后，估计 II 型细胞在细胞悬液中所占的比例。染色操作步骤如下。

72

(8) 首先，分离的细胞以 2×10^5 个/cm^2 准备载玻片，风干过夜。

(9) 在 Harris 血毒素中孵育玻片 3~4min。

(10) 蒸馏水冲洗 2~3 次，然后在碳酸锂溶液中孵育 2min。

(11) 蒸馏水冲洗，分别在 50%、80%、95%、100%乙醇中依次序孵育 90s、15s、15s、30s。

(12) 最后，在二甲苯：乙醇(1：1)混合液中孵育 30s，然后在纯净的二甲苯中孵育 60s，放大 1000 倍检查细胞[见注意事项(17)]。

3.3 类 I 型肺泡细胞表型的培养

(1) 在细胞培养基中重新悬浮 II 型细胞，控制其浓度，使接种在细胞培养载体(或其他细胞培养塑料制品)上的细胞密度为 1×10^6 个/cm^2[见注意事项(18)]。

(2) 在 Transwell 顶部和底面小室中的细胞培养基中，在 37℃、95%空气和 5% CO_2 条件下培养细胞[见注意事项(19)、(20)]。第一次换液时(48h)弃去未贴壁的细胞可进一步提高纯度。到第 2 天，II 型细胞的纯度应该在培养的细胞中大于 90%。

(3) 细胞培养 4~7d，每 48h 换液一次。细胞会伸展并铺满成单层，与 I 型细胞形态相像(表 7.1)。

(4) 用 Evom 上皮电压测量计可以测量在此过程中伴随着的跨上皮电阻的上升。到培养的第 6 天，细胞的跨上皮电阻应该大于 1500Ω · cm^2。

4 注意事项

(1) 多数分离 II 型肺泡细胞的方法都是基于胰蛋白酶和弹性蛋白酶这两种蛋白水解

酶而建立的[9]。已有综述表明应用弹性蛋白酶[11]或胰蛋白酶[10]的优点，并对酶对分离细胞影响的重要性进行了阐述。弹性蛋白酶在分离肺泡细胞中具有更大的优点，它不破坏基膜[11]，并且要培养类 I 型肺泡细胞单层就必须使用弹性蛋白酶。

(2) 纯化 II 型细胞主要备选方法是基于正在污染的细胞 Fc 受体的表达。培养皿可以用 IgG 包被，以结合 Fc 受体，这样使正在污染的细胞的停滞和清除。虽然不连续梯度纯化是比较常用的方法，但应用 IgG 包被技术对细胞产量和纯度的益处是肯定的[9, 12]。因为在应用胰蛋白酶分离的过程中可造成 Fc 受体的损伤，用这种酶得到的细胞就不能用 IgG 包被技术进行纯化。

(3) 大鼠的大小和体况影响细胞的产量和纯度。应用体重较小的(小于 250g)无特定病原(SPF)大鼠，其细胞产量会更高。如果不使用 SPF 大鼠，应用无垫料饲养的动物是明智的选择。

(4) 一些研究者在准备手术之前清理肺，先把大鼠肝素化。但是，如果解剖进行得迅速的话，这样做对提高最后细胞悬液的纯度或产量并无必要。

73

(5) 建议在灌洗液中加入 EDTA 以提高巨噬细胞的清除效率，应用 NaCl(或其他无 Ca^{2+}、Mg^{2+}离子的缓冲液)可能具有相似的效应。但是，酶液中 Ca^{2+}、Mg^{2+}对于最佳蛋白水解酶的活性是重要的。

(6) 商业化供应的酶不同批次之间的质量有波动。弹性蛋白酶的质量也需要仔细选择，每批的活性一定要仔细检查[9]。弹性蛋白酶也容易自发分解，可以通过化验来确定其活性的大小[10]。标记出不同活性单位来测定弹性蛋白酶活性是重要的。一个活性单位，可以通过测定琥珀酰-(*L*-analine)$_3$-p-硝基苯胺的方法来确定，与通过测定地衣红-弹性蛋白酶法确定 7 个活性单位是相同的[9]。华盛顿生物化学公司供应的弹性蛋白酶(大约 4U/mg，琥珀酰-(*L*-analine)$_3$-p-硝基苯胺法)(Lorne diagnostics, Reading, UK)是许多研究者的首选。

(7) 可以用 2mL 的饱和碳酸锂溶液(100mL 水中含 1g)加入到 158mL 蒸馏水中制成碳酸锂工作液。

(8) 当气管被剖开时，肺将会放气。并且要小心，不要切穿整个气管或让气管缩回尚未暴露的胸腔。

(9) 不要对肺造成任何伤害，这一点很重要。如果肺被刺穿，那么酶液会从肺中过度泄露。如果肺搓伤，在淤伤区域将得不到细胞。

(10) 如果肺发生进行性泄露，则要求抬高液体的位置，但需注意避免气泡的进入，因为气泡会堵塞肺导气管。

(11) 从此步骤开始需要使用无菌技术和器械。

(12) 细胞悬液应该充分混合，以分散任何细胞团块。

(13) 轻的 Percoll 溶液应小心地被平置于重梯度之上。在加入细胞悬液之前，不连续梯度应放冰上冷却。其他溶液，特别是 metrizamide(更昂贵)，曾经被用来制作不连续梯度。虽然是根据其大小和密度来选择 II 型细胞的，但建议使用 Percoll 具有理论上的优势(更小的毒性，无代谢)。

(14) 向轻 Percoll 溶液中加入酚红有助于区分轻/重 Percoll 界面，在界面处收集 II 型细胞。使用无振动的离心转头会改善界面处细胞带的形态。

(15) 虽然在不同的准备过程中 II 型肺泡细胞的产量有所波动，但纯化后得到的细胞数应大于 10^7 个。这代表着大约 10%的成年大鼠肺 II 型肺泡细胞的总量。

(16) 台盼蓝的吸收是时间依赖性的。如果培养液搁置过久，活细胞也会开始吸收染料。

74 (17) II 型细胞中的片层体被染成蓝色。正在污染的细胞不会被巴氏染料染色，可能也包括巨噬细胞或成纤维细胞(培养时细胞被明显拉长)。

(18) 细胞接种密度很重要。如果接种密度过低，细胞将不会形成铺满的单层；接种密度过高，只有少量的细胞会扩展，那么单层的跨上皮电阻会比较低。

(19) 在多孔细胞培养载体上培养细胞，将会在顶部和底面形成单层，可以研究其通透性。在按照细胞培养要求处理的塑料上、细颈瓶中、多孔板上也可能形成类 I 型细胞单层，在这些情况下细胞培养基只能沐浴到细胞的上表面。

(20) 紧密的类 I 型细胞单层的发育依赖于细胞培养基，特别是血清成分[7]。有人报道了一种严格的培养基，可更好地控制血清成分对培养的肺泡上皮细胞的影响[13]。

(王希朝 译　沈　政 校)

参 考 文 献

[1] Mason, R. J., Shannon, J. M. (1997) Alveolar type II cells, p. 543-556. In *The lung: scientific foundations. vol.* 1 (Chrystal, R. G., West, J. B., and Barnes, P. J., eds.). Lippincott-Raven, Philadelphia.

[2] Schneeberger, E. E. (1997) Alveolar type I cells, p. 535-542. In *The lung: scientific foundations. vol.* 1 (Chrystal, R. G., West, J. B., and Barnes, P. J.,eds.). Lippincott-Raven, Philadelphia.

[3] Forbes, B. (2000) Human airway epithelial cell lines for *in vitro* drug transport and metabolism studies. *Pharm. Sci. Tech. Today* **3**, 18-27.

[4] Elbert, K. J., Schafer, U. F., Schafers, H-J., Kim, K-J., Lee, V. H. L., and Lehr, C-M. (1999) Monolayers of human alveolar epithelial cells in primary culture for pulmonary absorption and transport studies. *Pharm. Res.* **16,** 601-608.

[5] Kim, K-J., Suh, D-J., Lubman, R. L., Danto, S. I., Borok, Z., and Crandall, E. D. (1992) Studies on the mechanism of active ion fluxes across alveolar epithelial cell monolayers. *J. Tiss. Cult. Methods* **14**, 187-193.

[6] Cheek, J. M., Kim, K-J., and Crandall, E. D. (1989) Tight monolayers of rat alveolar epithelial cells: bioelectric properties and active sodium transport. *Am. J. Physiol.* **256**, C688-C693.

[7] Dickinson, P. A., Evans, J. P., Farr, S. J., Kellaway, I. W ., Appelqvist, T. P., Hann, A. C., and Richards, R. J. (1996) Putrescine uptake by alveolar epithelial cell monolayers exhibiting differing transepithelial electrical resistances. *J. Pharm. Sci.* **85,**1112-1116.

[8] Kikkawa, Y. and Yoneda, K. (1974) The type II epithelial cell of the lung. I. Method of isolation. *Lab. Invest.* **30**, 76-84.

[9] Dobbs, L. G. (1990) Isolation and culture of alveolar type II cells. *Am. J. Physiol.* **258**, L134-147.

75 [10] Richards, R. J., Davies, N., Atkins, J., and Oreffo, V. I. C. (1987) Isolation, biochemical characterisation, and culture of lung type II cells of the rat. *Lung* **165**, 143-158.

[11] Dobbs, L. G., Geppert, E. F., Williams, M. C., Greenleaf, R. D., and Mason, R. J. (1980) Metabolic properties and ultrastructure of alveolar type II cells isolated with elastase. *Biochim. Biochem. Acta* **618**, 510-523.

[12] Dobbs, L. G., Gonzalez, R., and Williams M. C. (1986) An improved method for isolating type II cells in high yield and purity. *Am. Rev. Respir. Dis.* **134**, 141-145.

[13] Borok, Z., Danto, S. I., Zabski, S. I., and Crandell, E. D. (1994) Refined medium for primary culture de novo of adult rat alveolar epithelial cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **30A**, 99-104.

第 8 章　前列腺上皮细胞的分离和培养

77

David L. Hudson

1　引言

前列腺是男性生殖系统的一部分，是位于膀胱基部的一个小腺体，包围着尿道。虽然前列腺的功能尚不清楚，但是前列腺分泌物组成了精液成分的 30%左右[1]，并可给精子提供营养。前列腺特异性抗原(PSA)是分泌物中的成分，是糜蛋白酶的形式之一，其功能是作为抗凝剂维持精液的流动性。不幸的是，在老年这个腺体具有高发病的趋势。这些病之一是良性前列腺增生(BPH)，其症状为包围着尿道的前列腺过渡区发生增生性紊乱。上皮细胞和间质细胞在这个区域的增生可引起尿道堵塞，导致尿液流出障碍和严重的尿道问题。BPH 困扰着许多中年以上的男性，是许多老年男性需要手术的常见原因之一[2]。另外一种主要疾病是前列腺癌，发生于上皮细胞，是当前美国男性中最常见的癌症[3]。

近年来对前列腺病因的研究兴致越来越高，使前列腺细胞培养系统的发展达到了高潮。人和啮齿类前列腺有许多不同的解剖特征。虽然转基因动物的应用形成了一些对前列腺癌有用的鼠科模型[4]，但使用啮齿类细胞研究人类疾病并不理想。两种实验动物，狗和黑猩猩[5]也显示出有 BPH 类似的症状。但是在狗中所看到的过度增殖与人的情况是不同的，且对大多数研究者来说二者均不易得到。因此，作为啮齿动物模型的较好替代品，发展一些人类前列腺上皮和间质细胞的培养方法就显得十分重要。

78

在 Ham 开创性的工作之后[6]，已经发展了几种前列腺的无血清培养基。直到最近，主要使用两种培养基：① 以 WAJC-404 为基础的培养基，它本来是为大鼠细胞的培养而发明的[7]，后来发现它适合于人类器官上皮细胞的生长[8]；② Donna Peehl 等[9]发展的在 PFMR-4[10]基础上的优化培养基。这两种培养基均使用添加剂，包括霍乱毒素、表皮生长因子、胰岛素和牛垂体提取物。发现后者对低接种密度下良好的克隆生长很重要[9]。虽然这些培养基在某些实验室表现良好，但它们都基于复杂的基础培养基，从许多成分配制出来是有难度的。近来，BioWhittaker 公司推出一种前列腺上皮细胞生长培养基，称为 PrEGM，是 Clonetics™ 最优化培养基系列产品之一。供货时包含一份基础培养基和 9 份独立的冷冻的添加剂，包括牛垂体提取物。PrEGM 与 WAJC-404 相比具有很大的优越性[11]，并且，据 Peehl 等[9]报道，对于原代细胞来说，PrEGM 和 PFMR-4A[12]可以产生相似的克隆形成效率。

我们使用 PrEGM 已获得了良好的结果，因而相信 PrEGM 对任何涉足前列腺细胞培养研究领域的人都是一种好的选择。下面所概述的步骤就是以这种培养基为基础的。但是使用 PrEGM 的一个局限是，制造商不愿意透露培养基完整的配方和添加剂的浓度。而这可能对于某些研究来说是重要的。这里所描述的分离上皮类器官和单细胞悬液的技术，对所有培养方法来说都是通用的，同时，也适用于其他培养基。

可从外科手术过程中获得良性前列腺细胞的适宜组织，例如，完全的前列腺切除手术、前列腺活组织针刺检查、尸体检验、膀胱切除术和经尿道的前列腺切除术(TURP)。没有癌症和 BPH 的正常前列腺组织，通常只能从器官供者肾脏回收期间的年轻腺体上获得。BPH 组织是无病上皮细胞的良好来源，在活组织针刺检查和 TURP 标本上很容易获得，后者是我们所使用组织的主要来源。所有实验所使用的人类组织都需要得到地方医院伦理委员会的许可，这在任何项目开始之前都要预先做出计划。获得新鲜尸体材料是最困难的。同地方医院建立合作关系也是必要的，他们要求所得到的材料必须用于探索性诊断。从患者身上取得材料用于细胞培养时，他们也会提供协助。

79 本章将描述从含有成纤维细胞的基质中分离的管道上皮组织，并检索管道各段，或类器官，或单细胞悬液中这些细胞在饲养层上生长的方法。关于描述细胞起源和特异性的组织细胞化学方法包含在此书的其他章节中。

2 材料

(1) 转运培养液：含有 20mmol/L HEPES 的 RPMI 1640，每 100mL RPMI 1640(Life Technologies)中加入 0.48g 组织培养级的 HEPES(Sigma)到普通试管中。加入 10mL RPMI1640 到试管中并摇动直到溶解(可能需要几分钟)。通过 0.2μm 的注射器滤器对 HEPES 溶液进行过滤除菌。在余下的 RPMI 1640 中，加入 5%的胎牛血清(FCS)(加热灭活)(Sigma)，1%的青霉素-链霉素(Life Technologies)和 1%的两性霉素 B(Life Technologies)。

(2) 胶原酶溶液：RPMI 1640 加入 5% FCS(加热灭活)、200U/mL I 型胶原酶(Sigma)。称取需要的酶量放进普通的容器中。加入含 5 %血清的 RPMI，使酶的浓度达到 200U/mL，搅动使粉末溶解。通过 0.2μm 的注射器滤器过滤到一个清洁、无菌的试管中。

(3) 灭菌的无 Ca^{2+}、Mg^{2+}的磷酸盐缓冲液(PBS)(Life Technologies)。

(4) 等渗的盐缓冲液(Life Technologies)中加入 0.25 %胰蛋白酶和 0.02% EDTA 溶液。

(5) 加入 BulletKit®添加剂(Clonetics)的 PrEGM 生长培养基。购买 PrEGM 时，厂商同时提供分别冷冻的小份的表皮生长因子、氢化可的松、肾上腺素、转铁蛋白、胰岛素、视黄酸、三碘甲状腺氨酸、抗生素以及牛垂体提取物。这些药品应该冷冻保存，使用前室温解冻。完整的培养基应该于 4℃避光保存，每次只取需要的量预加温到 37℃。

(6) Vitrogen 100(Nutacon、Postbus 94、2450 AB Leimuiden、Netherlands)纯化的牛皮肤胶原，在灭菌的 PBS 中稀释到 10μg/mL。

(7) 小鼠胚胎 Swiss 3T3 细胞(ATCC)，在 T75 细颈瓶中培养[见注意事项 (1)]。

(8) 丝裂霉素 C 溶液。在 PBS 中溶解丝裂霉素 C 粉末(Sigma)到 0.4 mg/mL，过滤除菌。分成小份-20℃冷冻保存。

(9) 器械，预灭菌：

a. 装有 11 号刀片的解剖刀 2 把。

b. 小镊子。

c. 尖头剪刀。

(10) 灭菌的 30mL 普通容器。

(11) 一次性 1mL 和 10mL 吸管。

(12) 10cm 组织培养皿。

(13) 25cm^2 组织培养塑料细颈瓶。

(14) 轨道式平面摇床。

80

3 方法

3.1 组织的获得

(1) 从患者或供体身上取下组织之后要尽可能地快速收集。应该给手术室工作人员准备一个盛有预冷转运培养液的普通容器，以放置组织。

(2) 收集之后，将容器放置于冰上带回实验室，进行处理之前保持冷却状态。最好是取样后立即处理，但在从身体取下之后，其生理学反应和细胞活力至少能够保持 24h。

(3) 如果考虑进行组织学分析，每个样品应该在无菌条件下切下一小块放进甲醛中，以备组织学分析[见注意事项(2)]。如果组织来源的患者进行过 TURP 治疗，沿组织的纵向，每一段都应取下一部分以确定没有癌症。

(4) 在处理来自人的组织时，应注意遵守当地的生物危害安全规定，按照其推荐的处理方法进行操作，并按规定处理这些过程所产生的废弃物，这一点很重要。这包括，所有步骤中均应戴手套；所有器械和容器在清洁或丢弃前均应用漂白粉处理；多余的组织应用 4%甲醛固定过夜，作为有害废物处理。

3.2 组织的准备和消化

(1) 弃掉转运培养液。

(2) 用新鲜的转运培养液注入普通容器中清洗组织，翻动组织使其悬浮，然后在抽取培养液之前使组织下沉。

(3) 重复 2 次。

(4) 把组织倒进一个无菌的 10cm 皮氏培养皿中，用剪刀和刀片弃掉血凝块和烫伤的区域(应用 TURP 的情况下)。在此步骤可对组织称重以备将来参考。

(5) 先用尖头剪刀处理然后用斜形刀片(如 11 号刀片)尽可能地将组织切碎(大约为 1mm^3)[见注意事项 (3)]。

(6) 清洗无血液的碎组织块，转移到一个干净的普通容器中。

(7) 加入 20mL PBS，颠倒混合，并使组织块沉淀到底部。

(8) 5min 后，用 5mL 的吸管移去 PBS，注意不要吸去任何组织块。

(9) 重复 2~3 次，直到组织沉淀后 PBS 变得清亮。

(10) 每克组织加入 7.5mL 胶原酶溶液，在轨道平面摇床上 37℃轻柔摇动消化 18~20h。非常小的样品如针刺活组织检查的样品，需要更短的消化时间，2~4h 可能已被消化。

(11) 经适当时间的消化后，组织块减小，呈云雾肉汤状，不再看见大的组织块。

(12) 先用 10mL 吸管，再用 5mL 吸管反复上下抽吸以破碎任何余下的细胞团，使其产生肉汤样的混合物[见注意事项 (4)]。

81

(13) 为从消化的基质中的沉淀上皮腺泡，用离心机(如 Denley 牌)170*g* 离心 20s。

(14) 用宽嘴吸管小心弃去上层液，不要移走松动的细胞团块。

(15) 用 10 mL PBS 重新悬浮细胞团，重复 2 次。团块现在包含了相当纯净的上皮细胞类器官群(epithelial cell organoid)，可以用来直接进行培养或进一步消化以产生单一细胞悬液(如下文)。

3.3 培养板中类器官的培养

(1) 对类器官悬液，用每克原组织中加入 12mL PrEGM 的方法进行悬浮，并用吸管反复上下吹打以破碎任何大团块。

(2) 在胶原包被的 T25 细颈瓶中加入 4mL 培养基[见注意事项 (5)]。

(3) 把细颈瓶放在 37℃下，并确定培养架是水平的，安静放置 6d。

(4) 6d 后，用新鲜 PrEGM 代替培养液，注意不要搅动细胞类器官。从此步骤开始可以用显微镜观察类器官的扩展，再有 10d 细胞应能铺满[见注意事项 (6)]。图 8.1A 显示平板培养 6d 后细胞的外观。

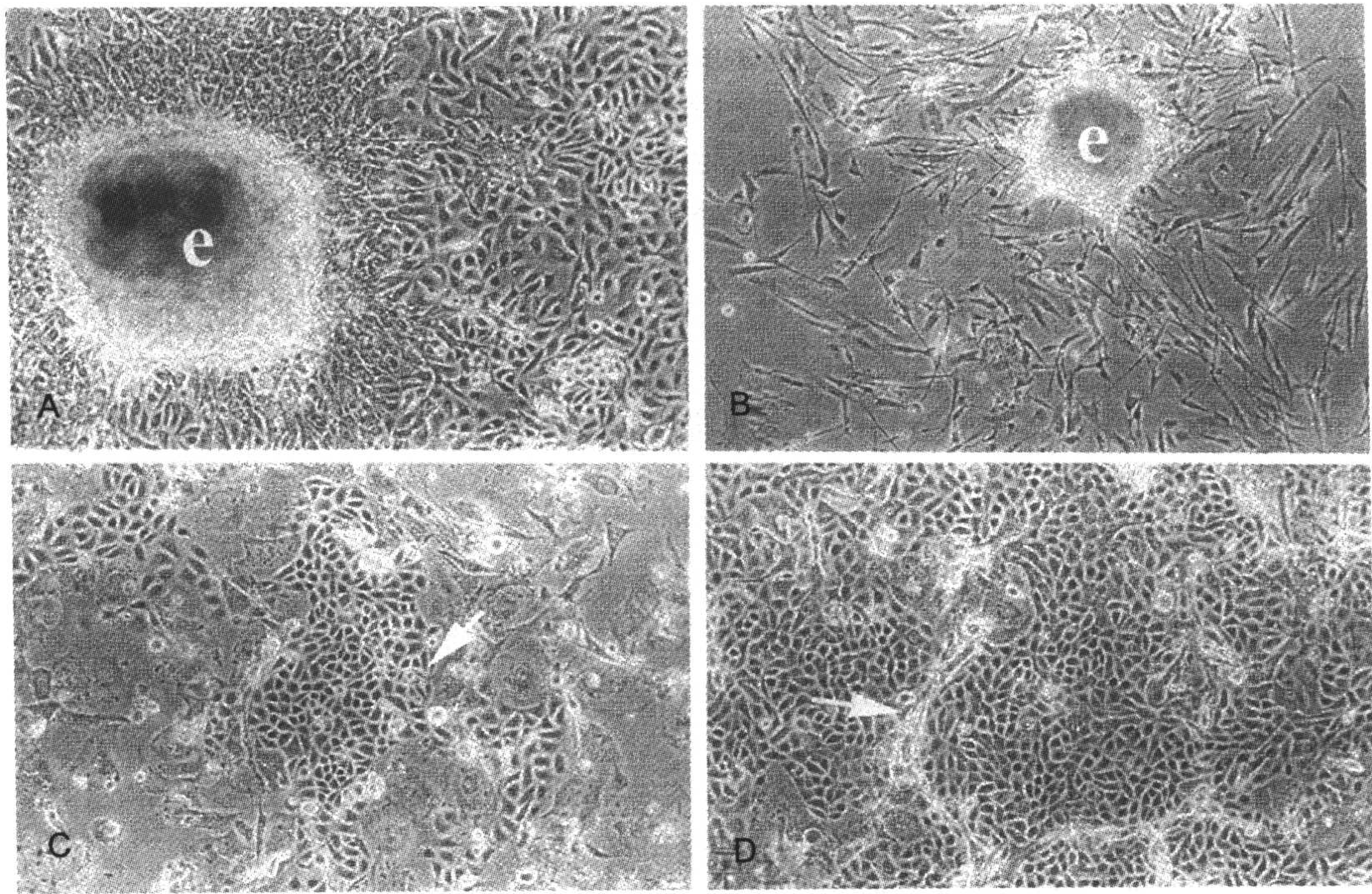


图 8.1 在 PrEGM 中培养 6d 前列腺原代细胞生长表现

(A，B)在胶原铺碟的塑料板上的外植体(e)，显示上皮细胞(A)或基质细胞(B)的扩展。(C，D)在 3T3 饲养层细胞上上皮细胞单细胞悬液以 10^3(C)或 3×10^5(D)个/6cm 培养皿的平板培养。(C)图的箭头示上皮克隆的边缘，(D)图的箭头示相连的上皮克隆之间接合部分离的 3T3 细胞。所有的照片均放大 100 倍。比例尺=200μm

(5) 利用差异胰蛋白酶化作用，可以消除任何来自基质的间质细胞的可见污染。在上皮克隆或外植体的边缘可见平滑肌或成纤维细胞的生长(图 8.1B)。

(6) 用记号笔在细颈瓶的底部做标记，标出含有污染的区域，以便确认。

(7) 用 5mL 无菌的 PBS 清洗，加入 1mL 胰蛋白酶-EDTA 溶液。

(8) 孵育 2min，然后小心吸取标记区域的胰蛋白酶 2 次或 3 次。

(9) 在显微镜下检查细颈瓶，确认所有污染细胞均被清除。然后弃去胰蛋白酶，换上生长培养基[见注意事项 (6)]。

3.4 单细胞悬液的平板培养

(1) 将 1/3 铺满的、丝裂霉素 C 快速处理的 3T3 细胞[见注意事项(7)]放入新鲜的 T25 细颈瓶中以准备饲养层细胞，使用前 2~24h 完成。

(2) 在准备好的上皮细胞类器官(见 3.2)中，加入 5mL 胰蛋白酶-EDTA 溶液，用吸管剧烈上下吹打数次。

(3) 37℃轻柔摇动孵育 20min，以分散细胞。

(4) 加入 10mL PBS 清洗 2 次，170*g* 离心使其沉淀。

(5) 第 2 次清洗后，用 5mL PrEGM 重新悬浮细胞团块并计数。

(6) 在饲养层细胞上以 10^3~10^4 个/T25 的密度接种细胞，并放回培养箱。6d 内可见小的克隆，10~14d 内培养的细胞应能铺满。图 8.1 显示 6d 后低密度(图 8.1C)和高密度(图 8.1D)接种所形成的克隆外观。

4 注意事项

(1) 鼠 3T3 细胞可以一直维持培养直到达到应用要求。细胞可以在添加 10% FCS 的 DMEM 中于 37℃、5% CO_2 条件下常规生长。细胞在将要铺满时要传代，传代前用 PBS 洗单层 1 次，然后加入 2mL 胰蛋白酶-EDTA 分离细胞 3~5min。用含有血清的 DMEM 使细胞悬液体积达 10mL，170*g* 离心 5min 使细胞成团块。在新细颈瓶中以 1∶3 到 1∶10 的密度接种 3T3 细胞。1∶3 密度接种的细胞培养 3d 达到铺满，而 1∶10 密度接种的培养 5~7d 达到铺满。

(2) 从患者身体上取下来的组织要送去进行病理检验，这足以确定临床诊断结果，但不能依此判断个体具有 TUR 的病理状况。

(3) 在此步骤中，应该用尽可能多的时间来制备细微的小块组织。这可以最大限度地提高胶原酶的消化效率。

(4) 在此步骤中，混合物包含游离的基质细胞悬液、已经被消化的结缔组织(大部分是胶原)，还有上皮团块和导管。

(5) 为了给细颈瓶包被胶原，可以在灭菌的 PBS 中稀释灭菌的 Vitrogen 100(主要包含牛 I 型胶原的溶液)至 10μg/mL。在 T25 瓶中加入 3mL 或在 T75 瓶中加入 5mL 进行包被。37℃孵育 1h；如果方便的话，可以 4℃过夜。之后，弃去包被液，用灭菌的 PBS 洗细颈瓶 2 次。加入培养液并把细颈瓶放在 37℃待用。

83

(6) 如果需要，利用上皮培养丢弃的细胞建立基质细胞培养是有可能的。包含基质细胞的胰蛋白酶溶液可用含有 10%血清的 DMEM 来抑制，然后 170*g* 离心 5min。用含有 10% FCS 的 RPMI 5mL 重新悬浮细胞，加入到细颈瓶。细胞会在接下来的 7d 内开始生长。

(7) 对不同类型的上皮细胞来说，Swiss 3T3 细胞是应用多年的较好的饲养层细胞，可以提供生长因子和细胞外基质的支持，允许比要求的接种密度低的上皮细胞形成克隆

生长[6]。应用 3T3 细胞作为饲养层细胞，细胞应该使用丝裂菌素 C 进行预处理。它能抑制细胞的分裂。应用丝裂菌素 C 的好处在于，它不要求特殊的设备(不像辐照的饲养层细胞)并且当需要细胞时操作简单。但是，当得到临床组织时，均要求细胞正在生长以保证其活力。准备细胞时，在有铺满细胞的细颈瓶中的培养基中加入丝裂菌素 C，使其终浓度达 4μg/mL(1∶100 稀释储存液)。37℃孵育 2h，弃去培养液，如注意事项(1)中所描述的那样，在用胰蛋白酶处理细胞前用灭菌的 PBS 洗 2 遍，然后在胶原包被的细颈瓶中[见注意事项 (5)]以 1∶3 的比例做水平培养。

(王希朝 译　沈　政　段恩奎 校)

参 考 文 献

[1] Cunha, G. R., Donjacour, A. A., Cooke, P. S., Mee, S., Bigsby, R. M., Higgins, S. J., and Sugimura, Y. (1987) The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocr. Rev.* **8**, 338-362.

[2] Oesterling, J. E. (1995) Benign prostatic hyperplasia. Medical and minimally invasive treatment options [see comments]. *N. Engl.* J. Med. **332**,99-109.

[3] Landis, S. H., Murray, T., Bolden, S., and Wingo, P. A. (1999) Cancer statistics, 1999 [see comments]. *CA Cancer J. Clin.* **49**, 8-31, 1.

[4] Sharma, P. and Schreiber-Agus, N. (1999) Mouse models of prostate cancer. *Oncogene* **18**,5349-5355.

[5] Steiner, M. S. Couch, R. C., Raghow, S., and Stauffer, D. (1999) The chimpanzee as a model of human benign prostatic hyperplasia [see comments]. *J. Urol.* **162**, 1454-1461.

[6] Ham, R. G. (1974) Nutritional requirements of primary cultures: a neglected problem of modern biology. *In Vitro.* **10**, 119-129.

[7] McKeehan, W. L., Adams, P. S., and Rosser, M. P. (1984) Direct mitogenic effects of insulin, epidermal growth factor, glucocorticoid, cholera toxin, unknown pituitary factors and possibly prolactin, but not androgen, on normal rat prostate epithelial cells in serum-free, primary cell culture. *Cancer Res.* **44**,1998-2010.

84

[8] Collins, A. T., Robinson, E. J., and Neal, D. E. (1996) Benign prostatic stromal cells are regulated by basic fibroblast growth factor and transforming growth factor-beta 1. *J. Endocrinol.* **151**,315-322.

[9] Peehl, D. M., Wong, S. T., and Stamey, T. A. (1988) Clonal growth characteristics of adult human prostatic epithelial cells. In *Vitro Cell. Dev. Biol.* **24**, 530-536.

[10] Lechner, J. F., Babcock, M. S., Marnell, M., Narayan, K. S., and Kaighn, M. E. (1980) Normal human prostate epithelial cell cultures. *Methods Cell Biol.* 195-225.

[11] Fry, P. M., Hudson, D. L., O'Hare, M. J., and Masters, J. R. W. (2000) Comparison of marker protein expression in benign prostatic hyperplasia *in vivo* and *in vitro. Br. J. Urol.* **85**,504-513.

[12] Hudson, D. L., O'Hare, M. J., Watt, F. M., and Masters, J. R. W. (2000) Proliferative heterogeneity in the human prostate: evidence for epithelial stem cells. *Lab. Invest.* **80**, 1243-1250.

第9章　牛乳腺内皮/上皮细胞血/奶屏障的培养模型

85

Albert Guidry　Celia O'Brien

1　引言

循环系统是身体器官之间的高速公路，能运送营养到不同的组织和清除废物。同时传送细胞和可溶性防御物质来保护身体不受外来病原的入侵。循环系统很复杂，但易于界定，相对易于研究。但是，通过血液运送营养、激素和细胞防御物质到身体不同器官的运动则复杂得多，也难于研究。每个器官都有其特殊的需求，都必须通过血液得到满足。研究通过血液满足这些需求的机制，则要求深入了解紧贴血管的细胞(内皮)和特殊的器官组织。在黏膜组织的研究中，上皮细胞转运或合成、分泌组织特异性产物，如乳腺分泌乳汁和初乳；肺吸收 O_2 和排出 CO_2；肠分泌消化酶、黏液和抗体。上皮细胞也可作为抵抗细菌、病毒、寄生虫、化学和生物危害的第一道防线。

腺体的复杂性，妨碍了在细菌感染乳腺过程中对宿主-病原相互作用的研究。本章描述了一种牛乳腺血/奶屏障的体外模型，此模型由乳腺内皮/上皮细胞构成，二者被细胞外基质所隔离。通过此模型，可以直接观察每种细胞在受到细菌或寄生虫侵袭、营养变化、抗生素治疗时等所发挥的功能，也可以研究抗生素从血液向腺体内腔或者从腺体内腔向血液的扩散、营养从血液向分泌性细胞的运输、乳腺的合成和分泌活动、乳腺不同细胞分泌细胞因子，以及细胞防御物质从血液向腺泡的运输。不同物种的其他组织也可以建立类似的模型。

86

本章详细介绍了牛乳腺血/奶屏障模型的准备方法，包括牛乳腺上皮细胞的分离步骤[1]、乳头管和乳汁管上皮细胞[2]、分泌性上皮细胞[3]、成纤维细胞[3]、细胞的低温储藏[3]、免疫细胞化学[1,3]，以及内皮/上皮细胞培养模型[4]的准备。

2　材料

2.1　内皮细胞的分离和培养

2.1.1　试剂和培养液

(1) Betadine®(The Purdue Ferderick)。

(2) HBSSs：494mL Hank 平衡盐溶液(HBSS)(Sigma)，1mL 1mol/L 的 HEPES 缓冲液，5mL 抗生素-抗真菌素溶液(Life Technologies)。

(3) 无菌解剖用具。

(4) 内皮细胞培养液：439mL DMEM F12K 培养液(Life Technologies)，50mL 胎牛血清(FBS)(Hyclone)，5mL 抗生素-抗真菌溶液，5mL 200mmol/L 的 *L*-谷氨酰胺(Life

Technologies)，1.0mL 50mg/mL 肝素(Sigma)。

(5) Kreb's Ringer 重碳酸盐溶液：0.1g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$，7.0g NaCl，0.1g 无水磷酸钠(二钠盐)，0.18g 无水磷酸钠(一钠盐)，1.26g 过碳酸钠，0.54g *D*-葡萄糖。加双蒸水(ddH_2O)至 1L。经 0.22μm 滤膜过滤。

(6) 胶原酶溶液 I：100mg 胶原酶(Sigma)，48mL Kreb's Ringer 过碳酸盐溶液，2mL 牛血清白蛋白(BSA)(Hyclone)。

(7) Dil-Ac-LDL：在培养液中 1∶40 稀释 Dil-Ac-LDL 储液(5μg/mL, Biomedical Technologies)。

(8) 杜氏磷酸盐缓冲液(PBS)(Sigma)。

(9) 胰蛋白酶-EDTA(Sigma)，不稀释。

(10) 兔抗 von Willebrand 因子抗血清(Dako Corporation)：在 PBS 中 1∶40 稀释。

(11) 含 0.5% Triton X-100 的 PBS(Sigma)。

(12) 异硫氰酸荧光素(FITC)标记的山羊抗兔 IgG(Kirkegaard & Perry)：在 PBS 中 1∶20 稀释。

(13) 正常兔血清(Sigma)：在 PBS 中 1∶40 稀释。

(14) 封片液：甘油∶PBS 为 1∶1。

(15) 0.1mol/L 乙酸(Sigma)中含有 0.1%小牛皮肤胶原。

(16) 含 3.7%甲醛的 PBS。

87

2.1.2 培养器具和设备

(1) 15mL 无菌的带盖锥形离心管。

(2) 50mL 无菌的带盖锥形离心管。

(3) $25cm^2$ 组织培养细颈瓶(Corning Costar)。

(4) 配备两个氩激光器的流式细胞仪，一个 514nm 的激光遮光滤镜，一个 550nm 的透光滤镜和一个细胞分选器。

(5) 配备若丹明滤镜的荧光显微镜。

(6) 倒置显微镜。

2.2 上皮细胞的分离

2.2.1 试剂和培养液

(1) Betadine。

(2) HBSSs：[见 2.1.1，步骤(2)]。

(3) 上皮细胞培养液：462mL RPMI 1640 (JRH Bioscience)，462mL DMEM，100mL FBS，10mL 抗生素-抗真菌素溶液，10mL 丙酮酸钠(1mmol/L)(Sigma)，10mL *L*-谷氨酰胺 (2mmol/L)，40mL HEPES 缓冲液 (40mmol/L)(Sigma)，0.5mL 牛胰岛素(5μg/mL)(Sigma)，1.0mL 氢化可的松(1μg/mL)(Sigma)，2mL 牛促乳素(1μg/mL)(National Hormone and Pituitary, Los Angeles County Harbor-UCLA Medical Center, 1000 W. Carson Street, Torrance, CA 90502, USA)。

(4) 胶原酶溶液 II：100mL HBSSs，40mg 胶原酶。

(5) 胰蛋白酶-EDTA。
(6) 0.1mol/L 乙酸中含有 0.1%小牛皮肤胶原。
(7) 台盼蓝：0.01mol/L PBS(pH7.4)(Sigma)中含有 1%台盼蓝。
(8) 70%乙醇。

2.2.2 培养器具和设备

(1) 15mL 无菌的带盖锥形离心管。
(2) 50mL 无菌的带盖锥形离心管。
(3) 用大鼠尾胶原(Becton Dickinson)预先铺碟的 60mm 培养皿。
(4) 25cm^2 组织培养细颈瓶。
(5) 2 室组织培养玻片(Fisher Scientific)。
(6) 200μm 尼龙网(Spectrum Laboratory)。
(7) 平流工作台。
(8) 荧光显微镜。
(9) 倒置显微镜。

2.3 细胞的冻存和解冻

2.3.1 试剂和培养液

(1) 二甲基亚砜(DMSO)(Sigma)。
(2) 台盼蓝。
(3) 冷冻培养液：70% RPMI 或 DMEM，10% DMSO，20% FBS。

88

2.4 上皮细胞培养

2.4.1 试剂和培养液

(1) 胰蛋白酶-EDTA。
(2) 台盼蓝。
(3) 培养液 II：同上。
(4) HBSS。

2.4.2 培养器具和设备

(1) 荧光显微镜。
(2) 倒置显微镜。
(3) 15mL 无菌的旋盖锥形离心管。
(4) 用大鼠尾胶原铺碟的 60mm 培养皿。
(5) 25mm^2 组织培养细颈瓶。
(6) 2 室组织培养玻片。
(7) 22mm×30mm 盖玻片。

2.5 免疫组织化学

2.5.1 试剂和培养液

(1) 小牛皮肤胶原(I 型)。

(2) HBSS。

(3) FBS。

(4) PBS。

(5) Bouin 氏液(Sigma)。

(6) 含水封片液(Biogenex)。

(7) 无 γ-珠蛋白的马血清，在 0.01mol/L PBS(pH 7.4)中稀释到 5%，加入 0.05% Tween-20(Life Technologies)。

(8) 兔抗 von-Willebrand 因子抗血清：在 PBS 中 1∶40 稀释。

(9) 鼠抗 α-平滑肌肌动蛋白单克隆抗体，在 PBS(Sigma)中 1∶200 稀释。

(10) 兔抗细胞角蛋白抗体，不稀释(Biogenex)。

(11) 鼠抗 Vimentin 单克隆抗体(Biogenex)。

(12) 荧光素标记山羊抗兔 IgG，在 PBS 中 1∶20 稀释。

(13) 荧光素标记山羊抗小鼠 IgG，在 PBS(Kirkegaard & Perry)中 1∶20 稀释。

2.5.2 培养器具和设备

(1) CO_2 培养箱。

(2) 水平摇床。

(3) 荧光显微镜。

(4) 2 室组织培养玻片。

2.6 细胞培养模型的准备

2.6.1 试剂和培养液

(1) 胰蛋白酶-EDTA。

(2) 小牛皮肤胶原(I 型)。

(3) 培养液 II：同上。

89

2.6.2 培养器具和设备

(1) CO_2 培养箱。

(2) 紫外光源。

(3) Millicell-ERS 电阻系统(欧姆计)。

(4) 微滴平板计数器。

(5) 无菌的 15mL 锥形离心管。

(6) 组织培养载体，直径 12mm，孔径 12.0μm(Millipore，cat. no. PIXP01250)。

(7) 24 孔组织培养板(Corning Costar)。

(8) 6 孔组织培养板(Corning Costar)。

(9) 96孔组织培养板(Corning Costar)。

3 方法

3.1 内皮细胞分离

(1) 在尸检时，摘除乳腺[见注意事项(1)]。

(2) 用 Betadine 洗乳房，再用水洗，然后用70%乙醇清洗。

(3) 尽可能多地收集乳腺动脉。

(4) 把这些动脉放进 1L 盛有冷的无菌 HBSSs 液的烧杯中，置于冰上送往实验室。

(5) 在无菌工作台中，把动脉放进碟中，其中的 HBSSs 应足够多，完全淹没动脉。

(6) 用剪刀去掉多余的组织。

(7) 用 HBSSs 冲洗动脉的内部。

(8) 用夹子夹住动脉的一端，灌入37℃胶原酶溶液 I。再夹住另一端和动脉所有的分支，以防止胶原酶泄漏。

(9) 用铝箔纸包裹脉管和夹子，放置于37℃、5% CO_2、15min。

(10) 从动脉的一端取掉夹子，轻轻倒出其中的液体到一个50mL 离心管中[见注意事项 (2)]。

(11) 用内皮细胞培养液冲洗动脉内部3次，收集冲洗液到一个50mL 离心管中。

(12) 用内皮细胞培养液灌注动脉，夹子夹住，用镊子按摩动脉令细胞从内表面脱落。

(13) 弃掉夹子，收集具有悬浮细胞的培养液到50mL 离心管中。重复步骤(12)、(13)各2次。

(14) 15℃、850*g* 离心 10min。

(15) 用5mL 内皮细胞培养液重新悬浮细胞，并转移到一个25cm^2的培养细颈瓶中。

(16) 在37℃、5% CO_2的培养箱内培养过夜。

(17) 内皮细胞黏附在细颈瓶底[见注意事项 (3)]。

(18) 弃去培养液，用37℃的培养液冲洗细颈瓶，加入5mL 新鲜的37℃内皮细胞培养液。

(19) 继续在37℃、5% CO_2的条件下培养，每2天更换一次培养液直到细胞铺满。

90

(20) 在倒置显微镜下观察细胞的铺满情况。当 90%~95%的内皮细胞铺满时，吸出培养液。

(21) 加入1mL 37℃的胰蛋白酶-EDTA 至25cm^2培养瓶，晃动培养瓶以保证所有的细胞都可以接触到胰蛋白酶，在37℃、5% CO_2的条件下培养5min[见注意事项 (4)]。

(22) 用倒置显微镜观察细胞[见注意事项 (5)]。

(23) 加入37℃内皮细胞培养液，加入量应大于或等于胰蛋白酶量[见注意事项 (6)]。

(24) 吸出悬浮细胞，加入到一个装有15mL、37℃内皮细胞培养液的75cm^2细颈培养瓶中、37℃、5% CO_2培养直到铺满。

(25) 吸出培养液，加入3 mL Dli-Ac-LDL 至75 cm^2培养瓶，用 Dli-Ac-LDL 标记细胞。

(26) 37℃、5% CO_2的条件下孵育2h。

(27) 孵育后，弃去 Dli-Ac-LDL，用 10mL HBSS 洗铺满的细胞单层。

(28) 弃去 HBSS，加入 3mL 37℃的胰蛋白酶-EDTA 至 $75cm^2$ 培养瓶，晃动培养瓶以保证所有的细胞都可以接触到胰蛋白酶，在 37℃、5% CO_2 的条件下培养 5min。

(29) 用倒置显微镜观察细胞。

(30) 轻敲细颈瓶使黏附的细胞松动。

(31) 吸出细胞悬液加入到一个 15mL 的离心管中，加入 50% FBS 以中和胰蛋白酶，15℃、850*g* 离心 10min。

(32) 用 0.5mL 内皮细胞培养液重新悬浮细胞团，并转移到一个 2.0mL 的圆底冻存管中。

(33) 室温下把细胞拿到分选器。

(34) 调节激光到 514nm、100mW，调节电压到 900V。

(35) 按照峰值荧光和沉降控制细胞，收集高荧光性的细胞到一个含有 10mL 内皮细胞培养液的 15mL 的离心管中。

(36) 放入 75 cm^2 的细颈培养瓶中 37℃、5% CO_2 的条件下培养，直到铺满。

(37) 重复步骤(25)~(35)[见注意事项 (7)]。

(38) 检查纯度，在用 0.1%小牛皮肤胶原预铺碟的 2 室组织培养玻片上每室放置 1×10^5 个细胞，37℃、5% CO_2 的条件下培养直到铺满，每 2 天更换一次培养液[见注意事项(8)]。

(39) 当玻片上的细胞铺满时，弃掉培养液。

(40) 把玻片浸入盛有含 3.7%甲醛的 PBS 的科普林染色缸(coplin jar)中固定细胞，室温下孵育 20min。

(41) 吸去多余的甲醛。

(42) 室温下把玻片浸入含 0.5% Triton X-100 的 PBS 中透明 15min。

(43) 吸去多余的 Triton X-100，在玻片的一个小室中加入用 PBS1∶40 稀释的抗 von Willebrand 因子的抗血清，在另一个小室中加入 1∶40 稀释的正常兔血清作为阴性对照[见注意事项 (9)]。

91

(44) 湿式温箱中 37℃孵育 30min。

(45) 用 PBS 洗玻片 3 次，每次 3min。

(46) 加入用 PBS 1∶20 稀释的 FITC 标记的山羊抗兔二抗于玻片上，37℃孵育 30min[见注意事项 (9)]。

(47) PBS 洗玻片 3 次，每次 10min。

(48) 吸去多余的 PBS，用封片液封片(甘油∶PBS 为 1∶1)。

(49) 用配备了若丹明滤镜的荧光显微镜观察[见注意事项(10)]。

(50) 一旦可以从形态和染色上确定了是纯上皮细胞培养，就在 $75cm^2$ 培养细颈瓶中进行扩增。

(51) 用胰蛋白酶处理后，在显微镜玻片上混合 50μL 等体积的细胞悬液和台盼蓝，少量放在血细胞计上对细胞总数和活细胞进行计数[见注意事项 (11)]。

(52) 计算出活细胞数目。

(53) 离心并重新悬浮细胞，使其浓度在培养液中达到 5×10^6 个/mL，为以下所描述

的模型或在冷冻培养液中冻存做准备。

3.2 上皮细胞分离

3.2.1 乳头管上皮细胞分离

(1) 屠宰后立即摘除乳房，用 Betadine 洗，再用水洗，然后用 70%乙醇冲洗。

(2) 用镊子在其基部夹住乳头堵塞乳头管，在无菌操作条件下用手术刀从乳房上取下乳头。

(3) 浸入放有 HBSSs 的烧杯中，盖上铝箔纸运往实验室。

(4) 经套管用 5mL HBSSs 冲乳头 2 次，通过细管和乳汁管排出 HBSSs。

(5) 注入乳头管 5mL 胶原酶溶液 II，把整个乳头放在 HBSSs 中。

(6) 37℃、5% CO_2 孵育 30min。

(7) 把乳头从 HBSSs 中取出，用套管和注射器来回轻轻冲洗乳头管，使上皮细胞从乳头管内表面脱落，然后吸取细胞悬液放进一个 15mL 的离心管中。

(8) 用 HBSSs 冲洗乳头管 2 次以获得其余脱落的细胞。

(9) 注入新鲜的胶原酶溶液 II，在 HBSSs 中 37℃孵育 30min。

(10) 5h 内每 30min 重复消化一次，每次得到的样品单独分开。

(11) 通过 200μm 的尼龙网过滤每份样品到一个 50mL 的离心管中，用 HBSSs 帮助过滤。

(12) 100*g* 离心 5min，用 10mL HBSSs 洗 2 次以除去剩余的酶。

(13) 在 10mL HBSSs 中悬浮细胞。

(14) 在显微镜玻片上混合 50μL 等体积的细胞悬液和台盼蓝，少量放在血细胞计上，对细胞计数并确定活细胞数目[见注意事项(11)]。

(15) 计算出活细胞数目。

(16) 离心并重新悬浮细胞，使其浓度在上皮细胞培养液中达到 5×10^6 个/mL，取出 1mL 放在盛有 4mL 预热的上皮细胞培养液的 60mm 培养皿中，立即培养或悬浮在冷冻培养液中按照 3.3 所描述的那样进行冻存。

3.2.2 乳导管上皮细胞分离

(1) 屠宰后立即摘除乳房，用 Betadine 洗乳房，再用水洗，然后用 70%乙醇清洗。

(2) 无菌摘除紧靠乳池前面的一块大乳导管网络。

(3) 用镊子和解剖刀片暴露出乳导管内层。

(4) 用 HBSSs 冲洗上皮。

(5) 用解剖刀轻轻刮下上皮细胞，在 HBSSs 中悬浮刮取物。

(6) 用 200μm 的尼龙网过滤将悬浮的细胞过滤到 50mL 离心管，以 HBSSs 帮助过滤。

(7) 100*g* 离心 5min，用 10mL HBSSs 洗 2 次。

(8) 悬浮于 10mL HBSSs 中。

(9) 在显微镜玻片上混合等量(50μL)上述细胞悬浮液和台盼蓝，然后移一点到血细胞计数器中，确定细胞计数和活细胞数。

(10) 计算活细胞数。

(11) 离心并重新悬浮细胞，使其浓度在上皮细胞培养液中达到 5×10^6 个/mL，取出 1mL 放在盛有 4mL 预热的上皮细胞培养液的 60mm 培养皿中，立即培养或悬浮在冷冻培养液中按照 3.3 所描述的那样进行冻存。

3.2.3 分泌腺上皮细胞分离

(1) 屠宰后立即摘除乳房，用 Betadine 洗乳房，再用水洗，然后用 70%乙醇清洗。

(2) 从通往大管道系统的分泌腺组织的背侧，避开大血管和乳导管，切几个 50g 大小的分泌腺组织块。

(3) 室温下浸入 HBSSs 中，运往实验室。

(4) 用 HBSSs 洗 2 次以除去剩余的乳汁，放进一个灭菌的 100mm 皮氏培养皿中。

(5) 用 HBSSs 湿润并切成 5g 大小的块。

(6) 用 HBSSs 洗组织块 2 次。

(7) 用镊子和剪刀把组织剪碎。

(8) 把碎组织块转移到一个盛有 50mL HBSSs 的细颈瓶中，室温下摇动 5min。

93

(9) 令大组织块沉淀，倒出上层液体。

(10) 反复洗涤，直到上层液体清亮。

(11) 用胶原酶溶液 II 代替 HBSSs 液每克组织 5mL，37℃摇动 30min。

(12) 用 200μm 的尼龙网过滤，收集分散的细胞，用 37℃ HBSSs 液帮助过滤。

(13) 回收未消化的组织到细颈瓶中，在 5h 内每 30min 重复消化一次。

(14) 100*g* 离心滤出液 5min，用 10mL HBSSs 洗 2 次。

(15) 用 10mL HBSSs 进行悬浮。

(16) 在显微镜玻片上混合 50μL 等体积的细胞悬液和台盼蓝，少量放在血细胞计上，对细胞计数并确定活细胞数目[见注意事项 (11)]。

(17) 计算出活细胞数目。

(18) 离心并重新悬浮细胞，使其浓度在上皮细胞培养液中达到 5×10^6 个/mL，取出 1mL 放在盛有 4mL 预热上皮细胞培养液的 60mm 培养皿中，立即培养或悬浮在冷冻培养液中按照 3.3 所描述的那样进行冻存。

3.2.4 成纤维细胞分离

从乳头和分泌腺组织中消化 3~5h 所得到的细胞中大约有 50%是成纤维细胞。成纤维细胞呈星形或梭形，分布于上皮岛之间。由于成纤维细胞在胶原上生长速度比上皮细胞更快，因此，通过在传代早期用温和的胰蛋白酶消化、反复传代培养就能使成纤维细胞得到纯化。

3.3 细胞的冻存和解冻

(1) 如 3.1 和 3.2 所描述的那样，离心并重新悬浮内皮、上皮、成纤维细胞，使其浓度在冻存培养液中达到 5×10^6 个/mL。

(2) 在 2mL 的冻存管中每管冻存 1mL。

(3) −15℃冷冻 15min，然后转移到−80℃[见注意事项 (12)]。

(4) 放在 37℃水浴中解冻，直到出现少量冰晶，以备培养。

3.4 上皮细胞培养

(1) 用上皮细胞培养液悬浮新鲜分离的或冻存的细胞，使其浓度达到 5×10^5 个/mL[见注意事项(13)]。

(2) 把 5mL 细胞悬液放在 60mm 的培养皿上，轻轻晃动，使细胞均匀分散。

(3) 37℃、5% CO_2 条件下培养，每 48h 换一次培养液[见注意事项(14)]。

(4) 大约 10~14d，当 80%的上皮细胞铺满时，弃掉培养液并用 HBSSs 洗 2 次。

94

(5) 用 5mL 胰酶-EDTA 替换 HBSSs，在 37℃、5% CO_2 的条件下培养，用倒置显微镜定期观察，确定大多数细胞可移动的时间[见注意事项(4)]。

(6) 把细胞悬液转移到一个盛有等量 HBSSs(添加 50% FBS)的离心管中，进一步终止胰酶的消化。

(7) 细胞用 HBSSs 洗 2 次，在培养液中重新悬浮使其浓度达到 5×10^6 个/mL，以便进一步在 60mm 培养皿上培养，或在 25cm^2 细颈培养瓶中扩增细胞数目，用于在小室玻片上培养，然后进行免疫细胞化学研究。

3.5 免疫细胞化学

(1) 用胶原包被培养玻片。在 2 室培养玻片的每个室中放入 0.5mL 小牛皮肤胶原，4℃过夜干燥。

(2) 用 HBSSs 洗涤。

(3) 在 2 室培养玻片上，向每个小室中加入含 10^5 个细胞的上皮细胞培养液，37℃、5% CO_2 的条件下培养，每 48h 换培养液一次，直到细胞铺满。

(4) 当细胞铺满时除去培养液，在 37℃用 HBSSs 洗 2 次，每次 5min。

(5) 加入 1mL Bouin 氏液固定细胞，摇动孵育 15min。

(6) 用 PBS 冲洗细胞直到 PBS 清亮。

(7) 在每个室中加入 1mL 稀释的无 γ-球蛋白的马血清，以封闭一抗的非特异性结合。

(8) 室温下摇动孵育 30min。

(9) 弃掉封闭液，分别在不同的室中加入 1mL 稀释的一抗：上皮细胞(加入兔抗细胞角蛋白抗体)，内皮细胞(加入兔抗 von Willebrand 因子抗体)，平滑肌细胞(加入小鼠抗 α 平滑肌肌动蛋白单克隆抗体)，成纤维细胞(加入鼠抗 vimentin 单克隆抗体)[见注意事项(9)、(15)]。

(10) 室温下摇动孵育 1h。

(11) 弃掉一抗，用 PBS 洗 3 次，每次 5min。

(12) 加入 1mL 稀释的荧光素标记的山羊抗兔 IgG 或荧光素标记的山羊抗鼠 IgG，室温下避光摇动孵育 45min。

(13) 弃掉荧光素标记的抗体，用 PBS 洗 3 次。

(14) 从玻片上移去小室壁，用含水封片液封片。

(15) 应用荧光显微镜检查玻片上对应每型细胞的特异性染色[见注意事项(16)、(17)]。

3.6 细胞培养模型的制备

细胞培养模型的制备[见注意事项(18)]。

(1) 反转载体，在 Millipore 载体底部(载体上皮细胞侧)包被小牛皮肤胶原[见注意事项 (19)]。

95

(2) 室温过夜干燥。

(3) 反转载体，以同样的方式包被内皮侧。

(4) 把载体放在 6 孔培养板中并在板中加入上皮细胞培养液[见注意事项(20)]。

(5) 弃掉多余的培养液，并在胶原上加含 3×10^5 个成纤维细胞的培养液 75μL。

(6) 37℃、5% CO_2 的条件下培养 8h。

(7) 室温下将载体暴露在紫外光下 15min 使成纤维细胞衰竭[见注意事项 (21)]。

(8) 180°反转培养板使成纤维细胞暴露于紫外光下 15min。

(9) 在成纤维细胞顶部放置 75μL 小牛皮肤胶原，37℃、5% CO_2 的条件下培养过夜。

(10) 在胶原上放置 75μL 上皮细胞培养液(1×10^5 个/75μL)，37℃、5% CO_2 的条件下培养 8h。

(11) 反转载体，在载体的培养板小室侧加入 100μL 内皮培养液(含内皮细胞 10^5 个)。

(12) 培养细胞 6d，直到细胞层铺满，换液，每 2 天更换一次上皮培养液和内皮培养液。

(13) 用欧姆计每天测量跨细胞层的电阻，以确定细胞的铺满。把欧姆计的短极插入到载体内，放在 24 孔板的孔中[见注意事项(22)]。

(14) 为确定欧姆计测量铺满的稳定性，用 HBSSs 洗载体 2 次并在有载体的孔中加入 200μL 台盼蓝。

(15) 6h 内，每 30min 转移 24 孔板的 50μL 液体到 96 孔板的孔中，用读数器测定 570nm 的吸收值。用铺碟胶原的膜做阳性对照。这些孔的吸收值读出应快速进行，当单层铺满时有细胞单层的孔的吸收值应接近于 0[见注意事项(23)]。

(16) 一旦确定细胞单层铺满，此模型即可用于进一步的研究，例如，嗜中性粒细胞渗出、跨膜物质转运等(图 9.1)。

4 注意事项

(1) 除了最初摘除动脉血管的工作外，所有的工作均应在无菌的条件下进行。

(2) 动脉的端部可能已被堵塞，需要切断。

(3) 小的聚集很明显，细胞碎片和非黏附细胞会很快出现在培养液中。

(4) 胰酶消化应该保持在最小限度(大约 5min)，以避免细胞受伤。

(5) 细胞应该呈圆形。

(6) 培养液中的血清会中和胰蛋白酶。

(7) 重复进行培养和筛选细胞，直到得到纯净的内皮细胞。

(8) 继续培养剩余的细胞。

(9) 稀释度可随抗血清的批次而有所变化。

96

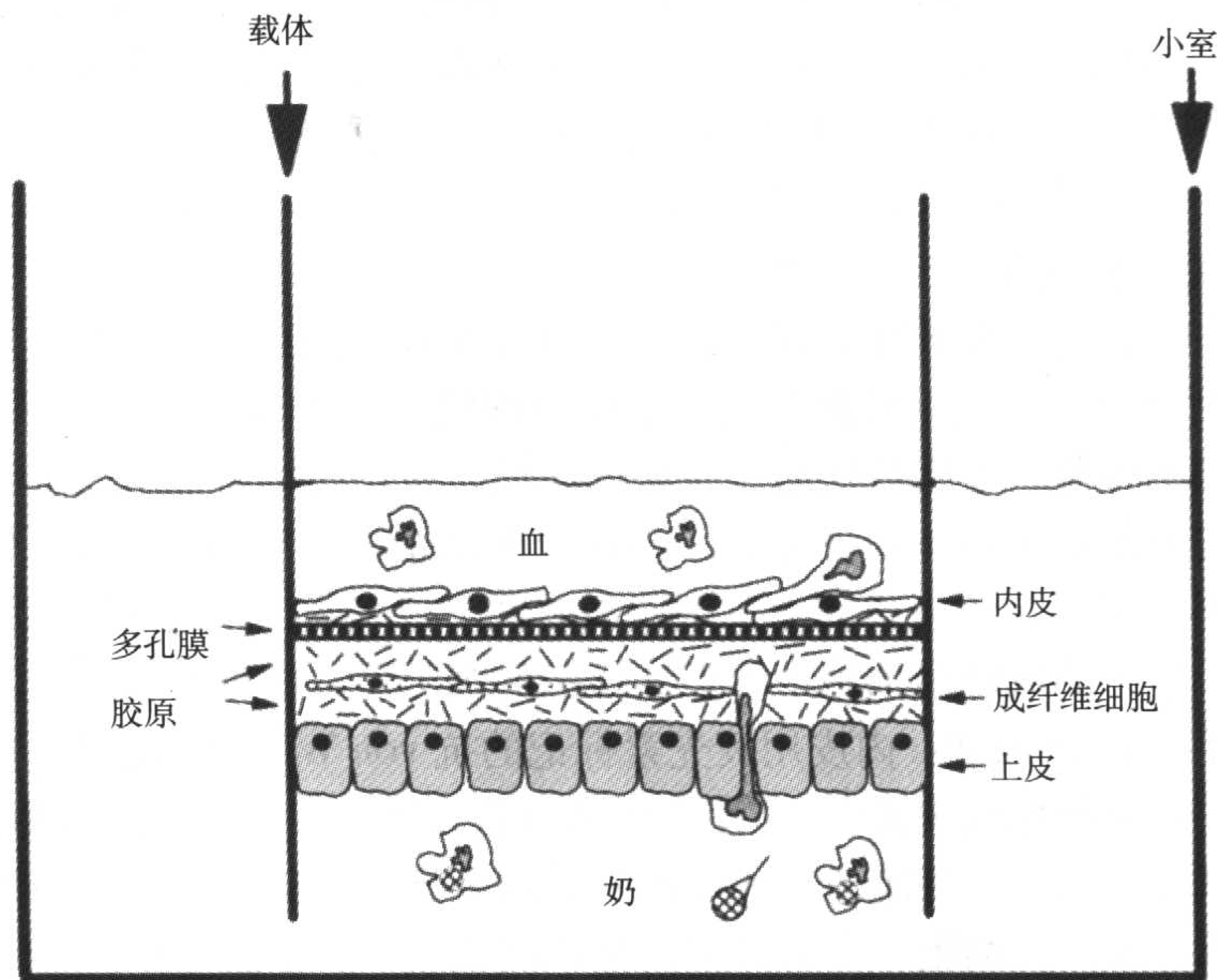


图 9.1　在分叶核白细胞渗出和调理菌噬菌期间血/奶屏障模式图

(10) Dli-Ac-LDL 和 von Willebrand 因子是典型的内皮细胞标志分子。平滑肌细胞和成纤维细胞对这些标志分子不染色。

(11) 死细胞能被台盼蓝染色。

(12) 如果细胞保存时间将超过 6 个月，则应保存在−150℃。

(13) 新鲜分离的细胞悬液中会存在小的(2~6 个细胞)和大的(20~100 个细胞)细胞团块。

(14) 培养 2~4d 后，用倒置显微镜观察细胞，应发现黏附的细胞、细胞团和大的漂浮在培养液中的非黏附细胞。黏附的细胞是单个的或成团的。细胞团扩增成小岛状，中央是高密度的细胞，细胞由中央向四周呈放射状生长。到第 7 天，围绕高密度中心的细胞增加，中央细胞萎缩。将要形成细胞小岛的细胞，有大细胞围绕在小岛周围[3,5]。小岛最后融合成铺满的单层。另外，对于特殊的免疫染色来说，乳腺细胞在形态学上呈现分泌特征。上皮细胞呈立方形，并形成鹅卵石状单层。最好在胶原酶对乳头的消化培养和对管道组织进行刮擦的早期，从乳头和管道组织得到纯净的上皮细胞进行培养[2,3,5~7]。成纤维细胞在上皮细胞岛之间呈现单个的星形和梭形[3]。与肌肉上皮细胞不同，它们中间宽，有多个尖钉形放射状突起。成纤维细胞可拧成束围绕在上皮岛周围[2]。纯成纤维细胞培养可形成松散的细胞层，细胞之间平行定位。培养分泌性上皮细胞时成纤维细胞污染难以控制，但可以用下述方法不断使用胰蛋白酶消化控制其到最小限度。乳腺内皮细胞比成纤维细胞显得更长，尖钉形放射状突起更少。与成纤维细胞不同，内皮细胞在单一培养时会形成单层。但是，不同器官的内皮细胞在结构、功能、抗原组成、代谢特征以及对生长因子的反应方面存在很大的差异[1]。所以，von Willebrand 因子和 Dli-Ac-LDL 染色应作为主要的鉴别标准。肌肉上皮细胞在胶原上以低密度培养时呈现尖钉形放射状

97

突起。肌肉上皮细胞铺满时，它们既不呈现上皮细胞的鹅卵石形态，也不像成纤维细胞的梭形形态[5~8]。如果这些标准在区分成纤维细胞和肌肉上皮细胞时被证明是不充分的，暴露于催产素时细胞的收缩可用来确定肌肉上皮细胞的存在。当乳腺上皮细胞如上所描述的那样分离和培养时，肌肉上皮细胞的污染并不是问题。

(15) 在一个小室中加入 PBS 作为阴性对照。

(16) 要避免染色过程中玻片干燥。

(17) 上皮细胞：在细胞质中角蛋白细丝呈现相互连接的束状。在核、胞质囊泡周围角蛋白网络密度更高，在细胞外围角蛋白走向与细胞表面平行[3]。一些外围细丝可通过桥粒延伸到相邻的细胞。多次传代后，细胞的胞质角蛋白网络可能减少，并局限在胞核周围区域。上皮细胞对 Vimentin 不染色，但可对肌动蛋白轻度染色。成纤维细胞：呈单个的星形或梭形细胞，位于生长的上皮细胞岛之间[3]。铺满后，成纤维细胞拧成束围绕在上皮岛周围。单一的成纤维细胞培养形成松散的细胞层，细胞平行走向。它们特异地对 Vimentin 染色。内皮细胞：内皮用荧光素标记的抗 von Willebrand 因子抗体染色，核周围显示强烈的颗粒状免疫荧光[1]。当使用配备有若丹明激发滤镜的荧光显微镜检查时，细胞对 Dli-Ac-LDL 染色，细胞质中显示出颗粒状荧光。此染色缘于次级溶酶体中乙酰化脂蛋白的积累。肌上皮细胞：含有许多高堆积度肌丝，少量胞质细胞器和延长的表面放射状突起和高密度不规则状核[9]。它们含有广泛的细胞骨架蛋白网络，包括α -平滑肌肌动蛋白、α-辅肌动蛋白和 Vimentin。肌上皮细胞也含有 Vimentin，但 Vimentin 纤维终止于核。肌上皮细胞超微结构组装成平滑肌纤维管道，这些管道在分化细胞中充满了大部分胞质空间。肌上皮细胞在此模型中未被使用，在此详细描述的目的是用于检查成纤维细胞的纯度[9~12]。

98

(18) 需有铺满的成纤维细胞、上皮、内皮细胞的平板。

(19) 不要使胶原流动透过膜。

(20) 反转载体以使载体的上皮细胞侧没有气泡。

(21) 时间决定于紫外灯的强度和滤膜至灯的距离。

(22) 依赖于欧姆计的调节，当细胞铺满时读数应等于或大于 1000Ω。

(23) 台盼蓝对细胞有毒。因此，台盼蓝附着只可用于检验铺满而不能用于进一步研究的情况下。

(王希朝 译　戴博杰　段恩奎 校)

参 考 文 献

[1] Aherne, K. M., Davis, M. R., and Sordillo, L. M. (1995) Isolation and characterization of bovine mammary endothelial cells. *Methods Cell Sci.* **17**,41-46.

[2] Cifrian, E., Guidry, A. J., O'Brien, C. N., and Keys, J. E. (1994) Bovine mammary teat and ductal epithelial cell cultures. *Am. J. Vet. Res.* **55**,239-246.

[3] Cifrian, E., Guidry, A. J., O'Brien, C. N., Nickerson, S. C., and Marquardt, W. W. (1994) Adherence of *Staphylococcus aureus* to cultured mammary epithelial cells. *J. Dairy Sci.* **77**, 970-983.

[4] Guidry, A. J. and O'Brien, C. N. (1998) A bovine mammary endothelial/epithelial cell culture model of the blood/milk barrier. *Can. J. Vet. Res.* **62**, 117-121.

[5] Smits, E., Burvenich, C., and Guidry, A. J. (2000) Adhesion receptor CD11b/CD18 contribution to neutrophil diapedesis across the blood/milk barrier. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **15**,255-650.

[6] Smlts , E., Burvenich, C., Guidry, A. J., Hayneman, R., and Massart-Leen, A., (1999) Diapedesis across mammary epithelium reduces phagocytic and oxidative burst of bovine neutrophils. *Immunol. Immunopathol.* **68**, 169-176.

[7] Smits , E., Burvenich, C., Guidry, A. J., and Roets, E. (1998) *In vitro* expression of adhesion receptors and diapedesis by polymorphonuclear neutrophils during experimentally induced *Streptococcus uberis* mastitis. *Infect. Immun.* **66**, 2529-2534.

[8] Smits, E., Cifrian, E., Guidry, A. J., Rainard, Pl, Burvenich, C., and Paape, M. J. (1996) Cell culture system for studying bovine neutrophil diapedesis. *J. Dairy Sci.* **79**,1353-1360.

[9] Zavizion, B. Politis, I., and Gorewit, R. C. (1992) Bovine mammary myoepithelial cells. 1. Isolation, culture, and characterization. *J. Dairy Sci.* **75**,3367-3380.

[10] Zavizion, B. Politis, I., and Gorewit, R. C. (1992) Bovine mammary myoepithelial cells. 2. Interactions with epithelial cells *in vitro. J. Dairy Sci.* **75**,3381-3393

[11] Zavizion, B., van Duffelen, M., Schaeffer, W., and Politis, I. (1995) Use of microinjection to generate an immortalized bovine mammary cell line with both epithelial and myoepithelial characteristics. *Methods Cell Sci.* **17**,271-282.

[12] Zavizion, B., van Duffelen, M., Schaeffer, W., and Politis, I. (1996) Establishment and characterization of a bovine mammary myoepithelial cell line. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **32**, 149-158.

99

第 10 章　血液-脑脊液屏障的培养

——脉络上皮细胞原代培养和跨上皮转运模式

Wei Zheng　Qiuqu Zhao

1　引言

两个主要的屏障系统把系统循环和脑间隔分开，从而保卫着中枢神经系统(CNS)的化学稳定性。在脑间隔内，神经和脑脊液(CSF)之间流动的组织间液(ISF)在主要脑组织和脑室之间循环。ISF 和 CSF 的直接联系允许脑间隔细胞外空间的物质自由交换。因此，分隔系统间隔与 ISF 的屏障就称为血-脑屏障，而分隔系统间隔与 CSF 间隔之间不连续循环的屏障就称之为血-CSF 屏障。血-CSF 屏障形成的组织，位于脑室内的脉络膜丛[1]。

在显微镜下，脉络膜丛由 3 层细胞构成：① 顶部的上皮细胞；② 下面的支持连接组织；③ 内皮细胞的内层。这些脉络膜上皮与其相邻的细胞顶部表面依靠紧密连接来密封。紧密连接构成了血-CSF 屏障的结构基础。该屏障阻碍了水溶性小分子、蛋白质、其他大分子以及离子由血向 CSF 的扩散。该屏障也分泌 CSF，大约组成了总 CSF 的

100

80%~90%。此外，该屏障还积极参与脑间隔动态平衡的调节。例如，脉络丛在血液和 CSF 之间双向转运多种氨基酸(如氨基乙酸、*L*-丙氨酸)、激素(如甲状腺激素、褪黑激素、生长激素)、多肽(如 atriopeptin、抗利尿激素)、蛋白质(如转甲状腺素蛋白)以及药物分子(如 β-内酰胺抗生素、甲腈咪胍、苄基青霉素)[1,2]。

随着血-CSF 屏障研究的快速发展，我们进行了大鼠脉络膜丛的脉络膜上皮细胞的原代培养。丛组织采自 Sprague-Dawley(SD)大鼠，消化后进行机械分离,然后进行细胞培养。通常 3~4 只大鼠丛组织的细胞产量为 2×10^5~5×10^5 个。最初接种 2d 后，用含有顺式-羟脯氨酸(cis-HP)的培养液代替原培养液培养 3~5d，以控制成纤维细胞的生长。然后在无 cis-HP 的培养液中培养。培养后多角形上皮细胞占多数，培养 2~3d 时细胞数目加倍。应用兔抗大鼠转甲状腺素蛋白(transthyretin,TTR)多克隆抗体的免疫细胞化学研究显示，该细胞对 TTR 呈强阳性染色，此蛋白质来源于脑中脉络膜上皮。除此之外，反转录聚合酶链反应(RT-PCR)也确定了该组织中表达特异性 TTR mRNA。

我们进一步改进了脉络膜上皮细胞的培养条件，将其夹在两个培养室之间自由通透性膜上进行原代培养。接种 5d 后形成了非通透性铺满细胞单层，单层的形成可用跨膜稳定电阻(100~180Ω · cm^2)的出现来确定。

此原代细胞培养系统和血-CSF 屏障相关体外模型，在血-CSF 屏障的甲状腺素转运以及铅对 CSF 转运毒性机制的研究中[3~5]，均被证明是有用的[对大鼠以外其他物种的参考，见注意事项 (1)]。

2 材料

2.1 培养皿的包被

(1) 0.1mg/mL 小鼠层粘连蛋白(Sigma)。

(2) Hank 平衡盐溶液(HBSS)(Life Technologies)。

(3) Transwell 培养小室，直径 12mm，孔径 0.4μm(Corning Costar)。

(4) 35mm 组织培养皮氏培养皿(Falcon)。

(5) 盖玻片。

(6) 0.1%来源于大鼠尾的 I 型胶原(Sigma)，在去离子水、双蒸水中稀释。

2.2 组织分离

(1) 雄性和雌性 SD 大鼠，4~6 周龄，80~90g(Hilltop)。

(2) 苯巴比妥。

(3) 解剖器械。

(4) 75%乙醇。

(5) 磷酸盐缓冲液(PBS)：800mL 去离子的双蒸水中加入 8.0g NaCl，0.2g KCl，1.44g Na_2HPO_4，0.24g KH_2PO_4。用 HCl 调节 pH 至 7.4，加水至 1000mL。高压灭菌，4℃储存。

101

2.3 细胞原代培养

(1) 消化液：4mg/mL 链霉蛋白酶(Calbiochem-Novobiochem)。在 1.5mL HBSS 中溶解 6mg。然后此溶液被转移至一个注射器中，通过 0.22μm 低蛋白结合过滤器过滤。最终储液(4mg/mL 或 0.4%)应在无菌橱中置于冰上直到应用。此溶液必须要在实验当天新鲜配制。

(2) 低蛋白结合过滤器(Millex-GV4，0.22μm)(Millipore)。

(3) 0.4%台盼蓝。

(4) cis-HP(Calbiochem-Novobiochem)。

(5) 0.25%胰蛋白酶，1mol/L EDTA(Life Technologies)。

2.3.1 生长培养液

以 DMEM 为基础培养液，正常的生长培养液由 3 个主要成分组成：① 抗生素防止感染；② FBS 提供营养；③ 表皮生长因子(EGF)刺激上皮生长。生长培养液通常在使用当天配制。

(1) DMEM(Life Technologies)。

(2) 抗生素-抗霉素 A(100×)溶液(Life Technologies)，其中包含 10 000U/mL 青霉素，10 000μg/mL 链霉素，25μg/mL 两性霉素 B。−20℃冷冻保存，使用当天解冻。

(3) FBS(Life Technologies)。FBS 溶液冷冻状态保存。使用前解冻时，冷冻的溶液应放在冰箱(4℃)过夜。在准备培养液的当天把 FBS 溶液放 37℃水浴中加热，然后 56℃、30min 灭活。现在可以从 Life Technologies 得到商品化已灭活的 FBS。

(4) 0.1mg/mL 小鼠 EGF(Life Technologies)。此溶液每小瓶包装为 0.1mg EGF /mL。到货后，应分装成 100μL 的小份，-20℃储存直到使用。此溶液至少在 3 个月内可保持稳定。

在 450 mL DMEM 中顺序加入储存溶液，最后总体积为 500mL。

储存溶液的量	终浓度
5mL 抗生素-抗霉素 A(100×)	100U/mL 青霉素
	100μg/mL 链霉素
	0.25μg/mL 两性霉素 B
50μL EGF(0.1mg/mL)	10ng/mL EGF
50mL 灭活的 FBS	10% FBS

102

通常在使用前临时把 FBS 加入培养液中。未被使用的培养液可储存于 4℃，以备下次使用。

2.3.2 无血清培养液

有些实验要求使用无血清培养液。

(1) 胰岛素-转铁蛋白-亚硒酸钠培养液添加剂(分别为 25mg/mL、25mg/mL、25μg/mL 包装)(Sigma)。

(2) 成纤维细胞生长因子(FGF)，来源于牛垂体腺体(10μg/小瓶)(Sigma)。

依次加入下列储存液到 494mL DMEM 中来制备总量为 500mL 的培养液。

储存液的量	终浓度
5mL 抗生素-抗霉素 A(100×)	100U/mL 青霉素
	100μg/mL 链霉素
	0.25μg/mL 两性霉素 B
50μL EGF(0.1mg/mL)	10ng/mL EGF
1mL 2.5mg/mL 胰岛素	5μg/mL 胰岛素
2.5mg/mL 转铁蛋白	5μg /mL 转铁蛋白
2.5μg /mL 亚硒酸钠	5ng/mL 亚硒酸钠
25mL FGF(10μg /mL)	5ng/mL FGF

4℃保存无血清培养液。

2.4 二室跨上皮模型

上皮电压计(EVOM 型)(World Precision Instruments，Sarasota，FL)。

2.5 免疫细胞化学研究

哥伦比亚大学人类营养研究所的 W. Blaner 博士惠赠纯化的大鼠 TTR 血清和特异性兔抗大鼠 TTR 多克隆抗体。

(1) 4%多聚甲醛，溶于 PBS。

(2) 0.05% Tween-20，溶于 PBS。

(3) 1∶1250 兔抗大鼠 TTR 抗体，溶于 PBS。

(4) 1∶200 生物素标记的山羊抗兔抗体(Vector Laboratory)，溶于 PBS。

(5) ABC 试剂(Vectastain®)(Vector Laboratory)。

(6) 荧光素结合的山羊抗兔抗体(Amersham)。

(7) 配备异硫氰酸荧光素(FITC)灯和相差镜片的显微镜。

2.6 RT-PCR

(1) RNAzol B RNA 分离溶剂(Tel-Test，Newark，NJ)。

(2) RNA PCR 核心试剂盒，包括鼠科白血病病毒(MuLv)反转录 Taq DNA 多聚酶和随机引物(Perkin-Elmer)。

(3) 来自牛胰腺的 DNase I(无 RNase)(Sigma)。

(4) 异丙醇(Sigma)。

(5) 二乙基焦碳酸(DEPC)(Sigma)。

(6) 氯仿。

(7) 乙醇。

(8) 大鼠 TTR 特异选择性引物(由 Keystone 合成)。

(9) RT 缓冲液：10mmol/L Tris-HCl(pH8.3)，50mmol/L KCl，5mmol/L $MgCl_2$，dATP、dTTP、dCTP 和 dGTP，每种 1mmol/L，20U 的 RNase 抑制剂(GeneAmp)。

(10) 0.15μmol/L 的寡聚核苷酸对。

(11) PCR 缓冲液：10mmol/L Tris-HCl(pH8.3)，50mmol/L KCl，2mmol/L $MgCl_2$。

(12) DEPC 处理的无 RNase 液：在 DEPC 处理的水(在 1000mL 去离子的双蒸水中加入 1mL DEPC，过夜，使用前高压灭菌)中加入 10mmol/L Tris(pH8.0)，1mmol/L EDTA，20mmol/L NaCl。

3 方法

3.1 培养皿的包被

层粘连蛋白是基膜的主要糖蛋白成分，其功能是帮助细胞黏附、扩展和生长[6]。胶原比层粘连蛋白更廉价，但对细胞黏附的效果与层粘连蛋白相差无几。

(1) 为了用层粘连蛋白包被培养皿或 Transwell 内室，用 HBSS 将层粘连蛋白储液(1mg/mL)进行 1∶10 稀释。

(2) 加入 1 份(100μL)稀释的层粘连蛋白液到 35mm 培养皿中或 Transwell 载体上，转动培养皿或载体以保证包被液的均匀分布。

(3) 室温下培养箱中孵育 10min。

(4) 弃去多余的液体，在细胞接种前，应在培养箱中风干至少 1h。

(5) 为了用胶原包被培养皿，用去离子的双蒸水稀释胶原至工作浓度 0.01%。

(6) 将 0.8 mL 此液体加入到 35mm 培养皿中。因为培养皿面积大约为 9.6cm^2，所以胶原的分布大约为 6~10μg/cm^2。

(7) 室温下把培养皿于无菌橱中放置 4~5h。

(8) 弃去多余的液体，在无菌橱中过夜风干包被的培养皿。

(9) 在包被的过程中要小心避免污染。

3.2 组织分离

图 10.1 显示了脉络膜上皮细胞原代培养步骤的流程。

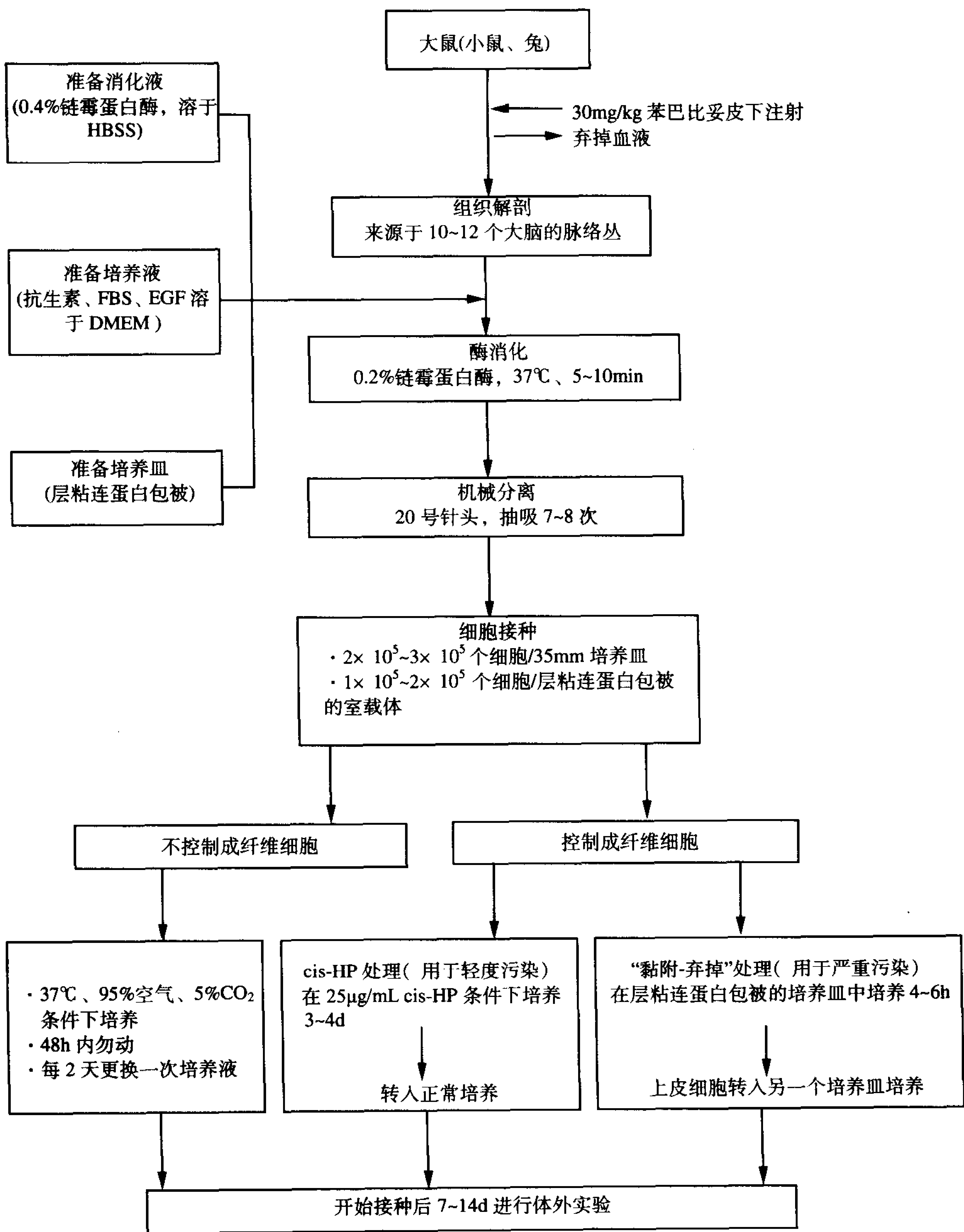


图 10.1 建立脉络膜上皮细胞原代培养步骤的流程

(1) 苯巴比妥皮下注射 30mg/kg，麻醉大鼠。

(2) 为了最大限度地减少脉络丛组织的血液污染，尽可能地用一个注射器从皮下静脉中抽血。

(3) 用剪刀除去头背部毛发。

(4) 用 75%的酒精棉球消毒暴露的皮肤。

(4) 从头盖骨处取出大脑，放在一个盛有 PBS、放置在冰上的烧杯中，以冷却组织并洗去多余的血液。

(6) 当收集到 5~8 个大脑时，在无菌橱中分离脉络膜丛。

(7) 解剖来自侧部和第三脑室的脉络膜丛，浸入 2mL HBSS 中。

(8) 当从 10~15 个脑中收集完组织时，用 HBSS 冲洗脉络膜丛，然后移到另一个盛有 0.5 mL HBSS 的烧杯中。

(9) 用精细的眼科剪刀切碎丛组织，体积大约为 $1mm^3$。

(10) 添加 HBSS 使其总体积至 1mL。

104

3.3 原代细胞培养

105

3.3.1 组织消化

(1) 在烧杯中加入 1mL 消化液，使链霉蛋白酶终浓度为 0.2%。

(2) 用手轻轻晃动烧杯，使消化液与组织完全混合。

(3) 37℃孵育 5~10min。

(4) 在消化混合物中加入 4mL HBSS 溶液终止消化反应[见注意事项(2)]。

(5) 800*g* 离心 5min，移去上清液，内含大部分非上皮细胞。

(6) 用 4mL HBSS 洗细胞团块，内含主要由上皮细胞组成的小细胞团(也许有紧密连接参与)。

(7) 用 4 mL 生长培养液重新悬浮。

(8) 通过 20 号标准针头强行抽吸 7~8 次机械分离细胞[见注意事项(2)]。

(9) 移出 1 份(0.1mL)细胞悬液，与 0.1mL 0.4%的台盼蓝混合，对细胞计数并估计活力。

(10) 按上述细胞分离步骤，每只大鼠可产生大约 0.8×10^5~1×10^5 个上皮细胞。

3.3.2 上皮细胞培养

(1) 接种细胞前，用生长培养液稀释细胞至大约 1×10^5~2×10^5 个/mL[见注意事项(3)]。

(2) 将细胞平铺于 35mm 包被的皮氏培养皿上(2×10^5~3×10^5 个细胞/培养皿)，在饱和湿度、95%空气、5% CO_2、37℃条件下培养。

(3) 首次接种后至少 48h 内勿动，以保证良好的细胞黏附。

(4) 培养期间每 2 天更换一次培养液。

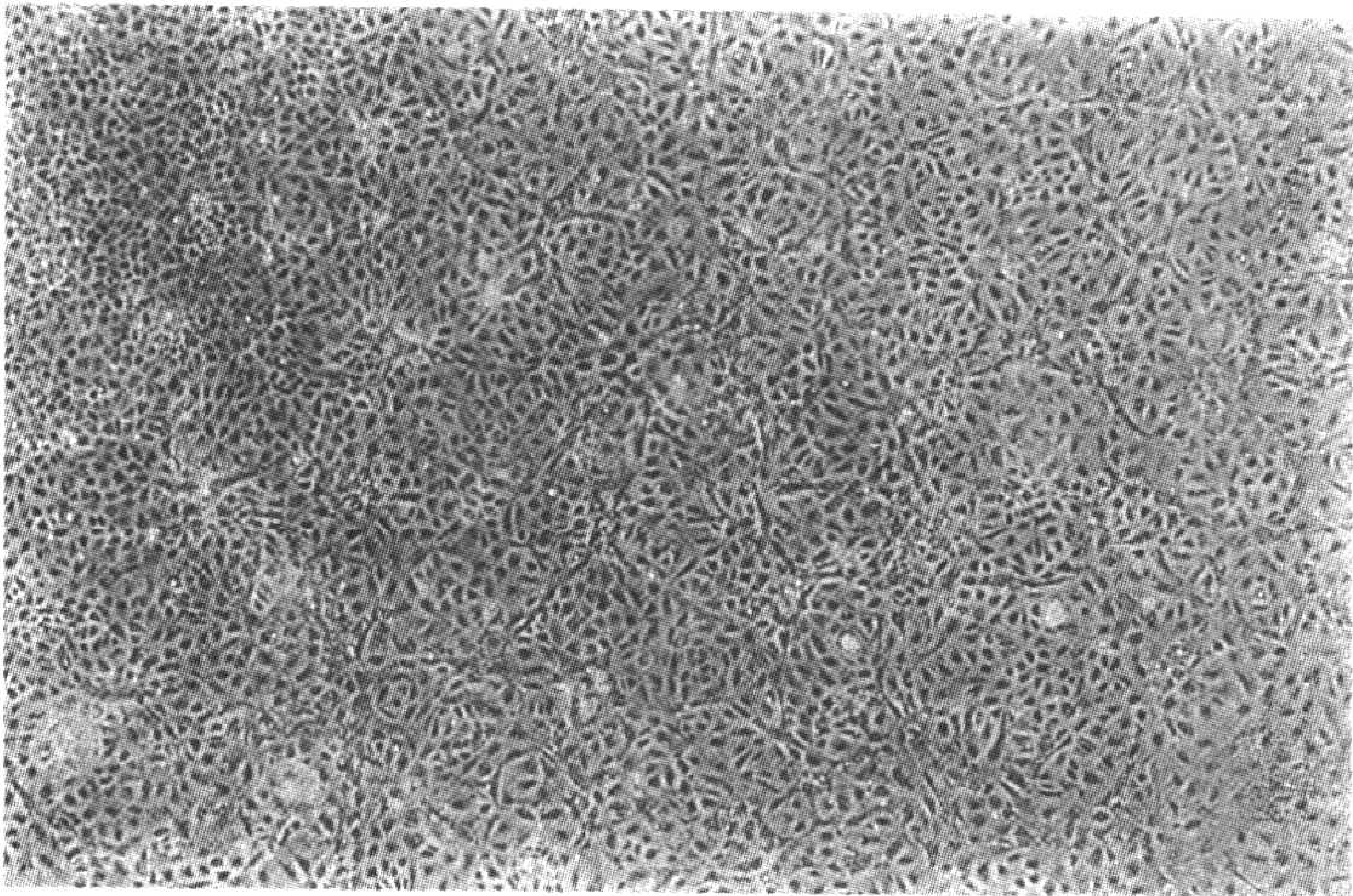
(5) 首次接种 2d 后，弃去培养液，用含有 25μg/mL cis-HP 的新鲜培养液更换，以控制成纤维细胞污染[见注意事项(4)]。

(6) 通常用 cis-HP 处理足以达到抑制成纤维细胞生长的目的。图 10.2 显示相差显微

镜下培养的脉络膜上皮典型的显微照片。

106

A



B

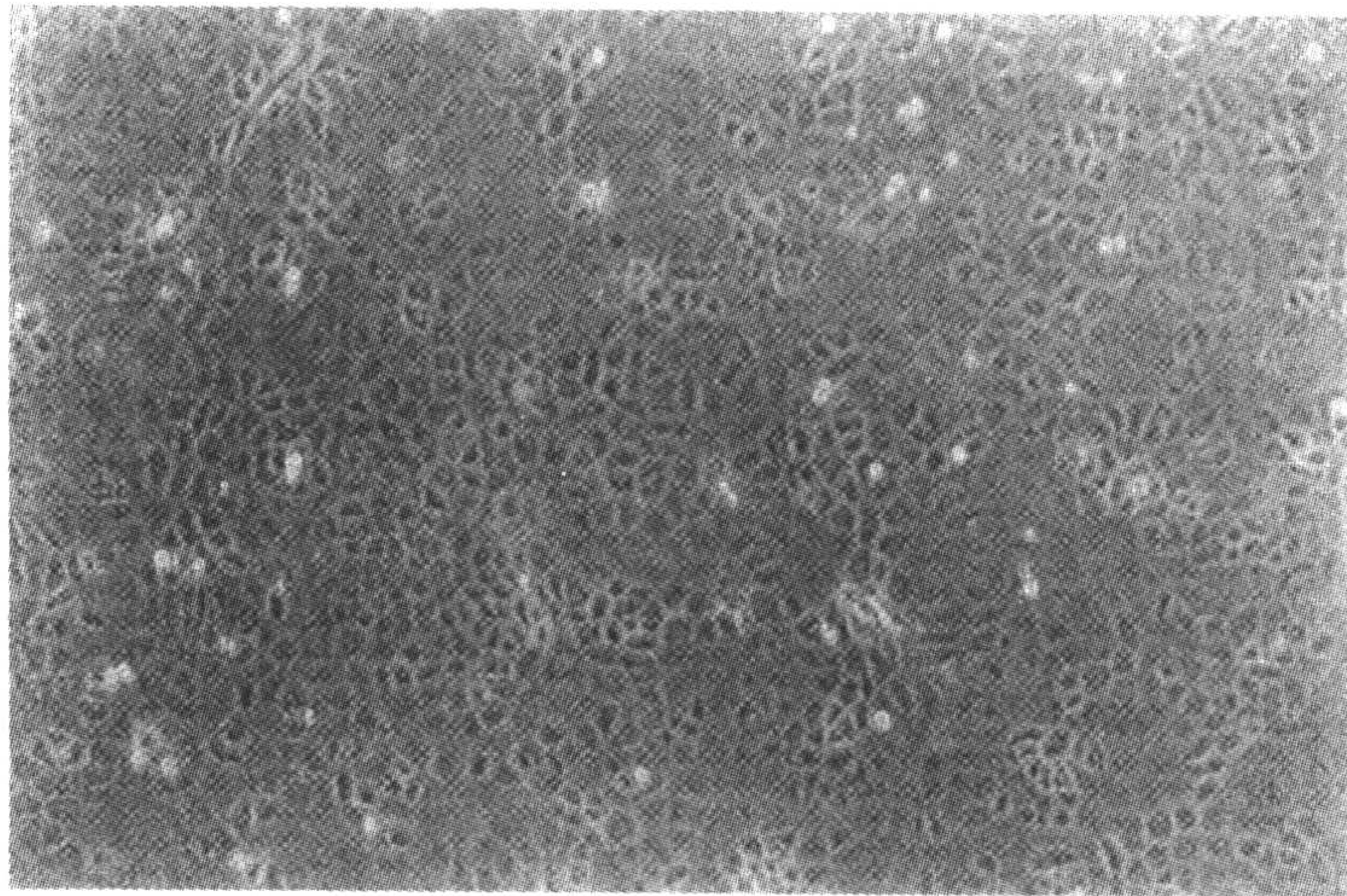


图 10.2 脉络膜上皮细胞原代培养 7d 后的照片：(A)×40，(B)×100

注意主要由多角形细胞组成的铺满的细胞层。脉络膜丛来自于 5 周龄的 SD 大鼠

(7) 用 cis-HP 培养 3~5d 后，只要显微镜下没有可见的成纤维细胞，就重新使用普通的不含 cis-HP 的培养液。

(8) 我们的经验是，只要正确执行消化步骤，一般情况下，上皮就会很快的黏附和生长。因此，用 cis-HP 处理不一定是必需的。

107

(9) 如果从老年动物(如年龄大于 4~6 月)身上获得脉络膜丛组织，培养时成纤维细胞的污染有时就可能成为一个严重的问题。用“成纤维细胞黏附-弃掉”的方法就可解决这一问题。

(10) 首先，把细胞接种在层粘连蛋白包被的培养皿上。

(11) 接种后 6h，把含有多数未黏附上皮细胞的培养液转移到另一个培养皿中，继续上皮培养。

(12) 此方法可有效地把成纤维细胞留在层粘连蛋白包被的培养皿中，因为通常成纤维细胞(孵育 4~6h)比上皮细胞(16~24h)能更快地黏附于层粘连蛋白包被的培养皿面上。

(13) 为了分离一些细胞进行生物学检测，可用溶于 PBS 的胰蛋白酶-EDTA 37℃孵育培养 10min。

(14) 收集细胞，离心并洗涤。细胞可用于进一步研究。

3.4 双室跨上皮模型

(1) 制备上皮细胞悬液的方法同 3.3 中所述。

(2) 细胞接种在 Transwell 内室(载体)之前，按照 3.1 中描述的方法，用层粘连蛋白包被贴在载体上的通透性膜[见注意事项(5)]。

(3) 每份(0.5mL)细胞悬液平铺于 12mm 层粘连蛋白包被的培养小室中(每个小室 2×10^5 个细胞)。

(4) 在外(基底)室中插入内室，外室中事先盛有 1mL 生长培养液(图 10.3)。

(5) 令细胞生长 48h。

(6) 此后，每 2 天更换一次培养液。

(7) 可用 2 个标准来判断非通透性细胞单层的形成：① 内室中培养液的高度比外室中的高出至少 2mm，持续 24h 以上；② 跨细胞层的电阻处于 100~180Ω · cm^2 范围内。

(8) 细胞在室中培养至少 4d 后，可用上皮电压计测量跨上皮电阻。

108

(9) 细胞接种室的电阻值减去背景值(可用无细胞的层粘连蛋白包被的室测量)，可计算出净电阻值。

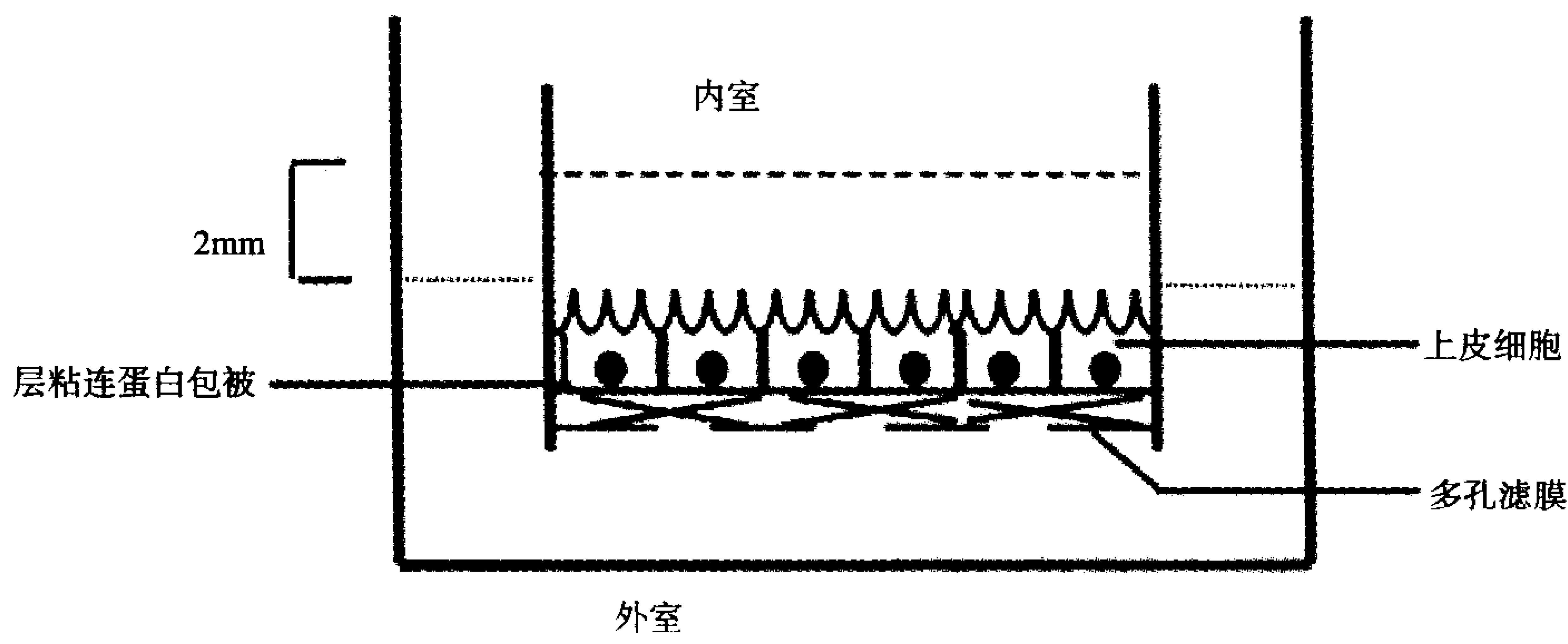


图 10.3 血-CSF 屏障跨上皮模型用于研究跨上皮转运

上皮细胞通过紧密连接在内外室液体之间形成屏障。内室中的液体接触细胞的顶部表面，外室中的液体接触细胞的基部表面

3.5 免疫细胞化学研究

鉴别脉络膜上皮细胞的一个可靠方法是TTR(脉络膜上皮细胞的特有分子)的出现[见

注意事项(6)]。TTR 是一个 55 000Da 的蛋白质，由 4 个相同的亚单位呈对称四面体组成。单位重量大鼠脉络膜丛 TTR mRNA 含量大于肝脏的 10 倍。每克组织，TTR 合成的速度是肝脏的 13 倍，脉络膜丛是产生血清 TTR 的主要器官[7,8]。

(1) 用于染色的细胞在层粘连蛋白包被的盖玻片上培养 5~7d。

(2) 用 PBS 溶解的 4%甲醛固定细胞。

(3) PBS 洗 3 次。

(4) 用含有 0.05% Tween-20 的 PBS 洗 3 次，使细胞单层透明。

(5) 室温下用兔抗大鼠 TTR 抗血清孵育细胞 30min。

(6) 用含有 0.05% Tween-20 的 PBS 洗 1 次以上，降低背景。

(7) 用生物素标记的山羊抗兔二抗孵育 30min。

(8) 用 ABC 试剂(Vectastain®)对培养的细胞进行染色，形成抗生物素蛋白-生物素-辣根过氧化物酶复合物。

(9) 对于免疫荧光染色，二抗应该是荧光素结合的山羊抗兔抗体，用上述同样的方法处理细胞。

(10) 在 FITC 荧光显微镜或相差显微镜下观察细胞(图 10.4)。



图 10.4 免疫荧光染色显示培养的脉络膜上皮细胞具有胞质 TTR

细胞先用抗 TTR 的一抗处理，然后用荧光素标记的二抗处理。注意细胞质中的阳性染色(×300)

3.6 RT-PCR 分析

虽然 TTR 蛋白免疫组化染色被认为是鉴定脉络膜上皮细胞的最好方法，但在当今市场中却难以得到商品化的抗大鼠 TTR 的抗体。因此，可以用替代的方法，即通过 RT-PCR 检查编码 TTR 的 mRNA 的表达，进而进行鉴定。

(1) 用 Sambrook 等[9]描述的步骤或用 RNA 分离试剂盒(RNAzol B)，从培养的细胞或大鼠肝脏(作为阳性对照)中提取总 RNA。

(2) 在RNAzol B溶液中对细胞或组织进行匀浆,然后用氯仿抽提除去DNA和蛋白质。

(3) 异丙醇中沉淀 RNA，再用 70%乙醇洗涤。

(4) 用 DEPC 处理的无 RNase 溶液重新悬浮。

(5) 转录前，用 DNase 处理 RNA 抽提物以除去污染的 DNA。

(6) 用 1μg 总 RNA 进行反转录反应，用随机六聚物(2.5μmol/L)或用溶于 20μL RT 缓冲液的选择性反义引物进行 MuLv 反转录。 109

(7) 42℃反应 45min。

(8) 为了进行 PCR 扩增,一套特殊的寡聚核苷酸对应该与以上反应混合物一起孵育。

(9) 加入 80μL PCR 缓冲液，内含 2.5U Taq DNA 聚合酶，将总反应体积加至 100μL。

(10) 循环参数为：94℃、5min 最初变性，55℃、5min 退火，72℃、0.5min 延伸。随后的循环为：94℃、1min，55℃、1min，72℃、0.5min，循环次数为 35 次。最后 72℃延伸 5min。

(11) 每个反应混合物的一部分(10μL)都应该在含 0.5μg/mL 溴化乙锭的 1.5%琼脂糖上进行电泳分析(图 10.5)。

(12) 我们设计的对大鼠 TTR 特异的引物(传统方法合成)包括：

正义引物：5'-CCTGGGGGTGCTGGAGAAT-3'

反义引物：5'-ATGGTGTAGTGGCGATGAC-3'

可以扩增出 317bp 的产物，覆盖大鼠大部分 TTR 成熟肽段[7]。

110

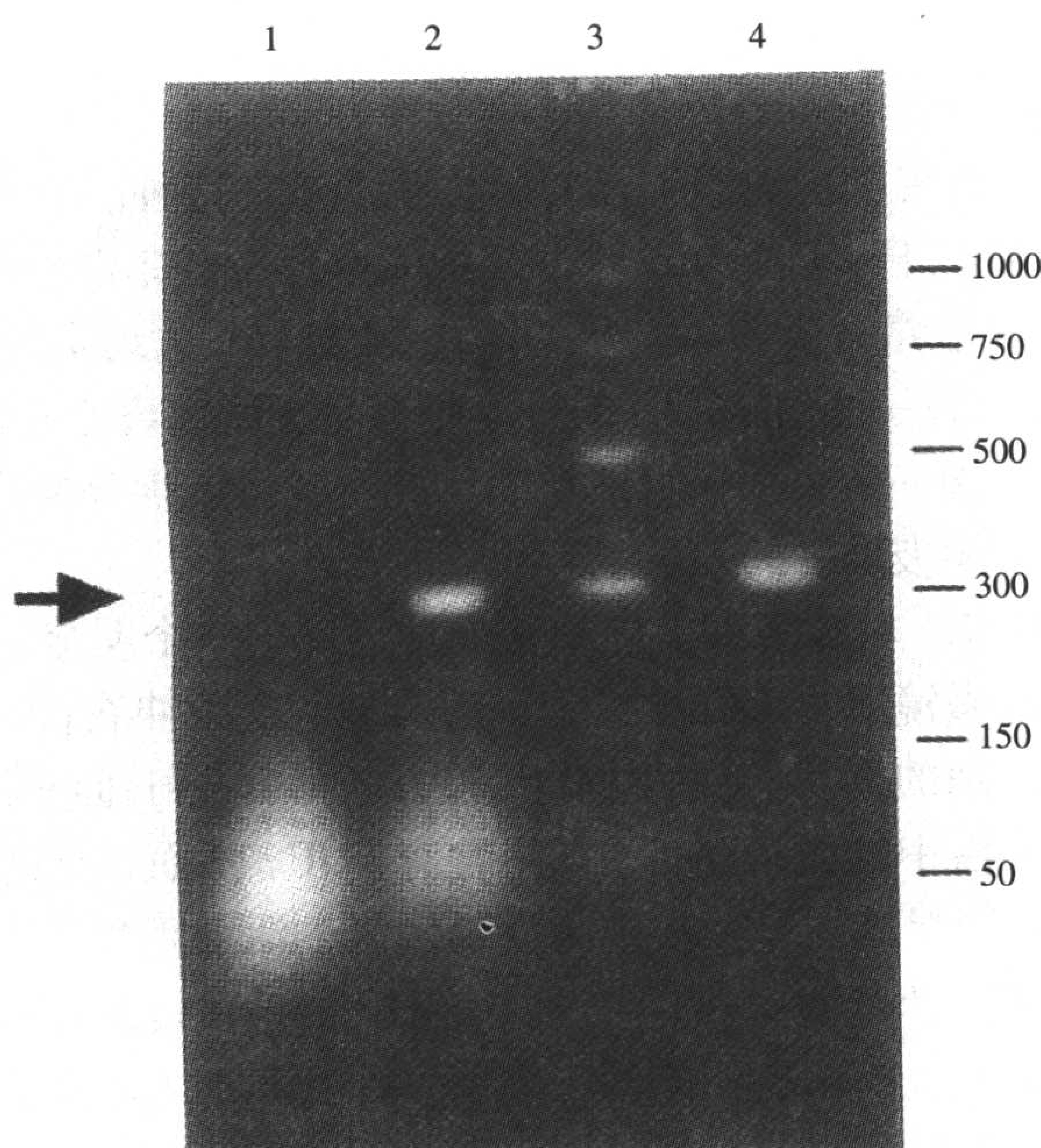


图 10.5 用 RT-PCR 分析培养的脉络膜上皮细胞表达 TTR mRNA

除非另有说明，所有样品都用 DNA 酶进行消化并进行 RT-PCR。箭头指示相应的 TTR mRNA 条带。泳道 1：培养的丛细胞，总 RNA 进行 PCR，没有反转录反应；泳道 2：培养的丛细胞，mRNA 带有特异性引物；泳道 3：碱基对 marker；泳道 4：肝脏，mRNA 带有特异性引物

4 注意事项

(1) 本方法也适用于其他物种来源的丛组织。我们曾经修改此方法以建立来源于小鼠、兔子和狗的脉络膜上皮细胞的原代培养。来源于小鼠和兔子的细胞，在形态和生长特性上与来源于大鼠的细胞有许多相似性，但是，来源于狗的细胞培养仍有问题。犬科丛细胞对链霉蛋白酶处理非常敏感，因为消化后只可见到很少黏附的上皮丛。从经济学角度看，在一个培养皿中培养大鼠丛细胞(通常需要 3 只大鼠)所需要支付的费用相当于培养兔子的细胞(每培养皿需 1 只兔子)。因此，培养哪种动物的细胞因研究的目的而定。

(2) 来自脉络膜丛上皮细胞的分离。为保证获得高产量的上皮细胞，消化步骤非常重要。我们曾试用胶原酶(2mg/mL)和链霉蛋白酶(2mg/mL)来消化组织，发现使用胶原酶处理导致细胞活力低下，细胞黏附不良。另一方面，使用链霉蛋白酶消化，虽然可以有效分离上皮细胞，但消化时间和浓度必须严格控制。理想的消化时间随组织块大小而变化。最重要的是要仔细观察培养液颜色的变化。完全消化的时候，液体通常由亮红色向浅橘黄色变化，由相当透明向云雾状变化。薄的细胞丛层会在烧杯底部形成可见的斑点。使用链霉蛋白酶消化，持续时间不要超过 10min，因为过长时间的消化会降低随后步骤细胞的黏附。应该注意的是，不同批次的链霉蛋白酶的活力通常有所变化。因此，需要对每批链霉蛋白酶进行测定以确定最佳消化条件。另一个看似琐碎，但绝对重要的步骤是细胞的机械分离。酶消化后上皮细胞团通常黏附于培养皿的表面；如果不进一步消化，则后面的克隆形成会比较少。使细胞强行通过针头可以有效地粉碎细胞团，产生最大量的上皮细胞，因此提高了细胞克隆数量和接种效率。

111

(3) 首次接种的细胞密度。健康生长的脉络膜上皮在接种阶段需要有足够数量的细胞。首次接种细胞总数小于 10^4 个/mL 时，细胞的增殖将会非常缓慢。我们推荐的细胞接种密度为每 35mm 的培养皿接种 2×10^5~3×10^5 个细胞，大约是消化后 1×10^5~2×10^5 个/mL 的 2mL 细胞液。另一个值得一提的技术细节是细胞由离心管向培养皿中的转移。转移细胞前玻璃管的顶端一定要用培养液湿润。此步骤可减少分离后的细胞丢失，否则分离的细胞易于粘在干燥玻璃管的顶端。

(4) 控制成纤维细胞。对脉络膜上皮细胞成功培养的一个明显的考验是控制成纤维细胞的污染。在光学显微镜下，成纤维细胞呈现典型的长条伸展状，核浓缩。成纤维细胞通常伸展在上皮丛之间的空间。我们尝试几种方法抑制成纤维细胞的生长。首先，我们尝试剔除或降低培养液中的血清，因为其中含有 FGF。然而，当把培养液中的 FBS 降低至 5%时，整体生长明显减弱，上皮细胞生长缓慢，活细胞数量降低。然后我们又尝试使用特异的成纤维细胞抑制剂 cis-HP[10,11]。cis-HP 的确可以抑制成纤维细胞的生长，但是它也影响上皮的正常生长。我们的经验表明，cis-HP 加入培养液的浓度和时间都是重要的。太高的浓度以及处理过早，虽然可以有效抑制成纤维细胞的污染，但同时也杀死了上皮细胞。我们发现 cis-HP 处理的最佳条件是首次接种后 48h 在培养液中加入 25μmol/L cis-HP。在培养年轻动物的丛细胞时此步骤效果良好。在培养至第 2 周期间，

112

如果在相差显微镜下见不到成纤维细胞，这时 cis-HP 在培养液中的添加量应逐渐减少。对于来源于老年动物(4~6 月龄)或其他较大的物种如狗的脉络膜丛，在消除成纤维细胞时

成纤维细胞黏附-弃掉法证明是实用的。此方法利用的是在早期细胞选择阶段，成纤维细胞比上皮细胞与胶原或层粘连蛋白包被的表面具有更高的亲和力。相对完全的成纤维细胞黏附，会发生在消化后的细胞在包被的培养皿中孵育 12h 后。但是，在此期间有少量的上皮细胞团也会黏附于包被的培养皿孔中，于是，在随后的细胞转移步骤中会遭受一定的损失。因此，黏附处理 4~6h 是适当的方法。

(5) Transwells 中的培养。除了细胞必须接种在层粘连蛋白包被的膜上以外，Transwell 膜上脉络膜上皮细胞的培养步骤与常规培养相同。生长在内室膜上的细胞与培养皿中观察到的细胞具有相似的形态，都可以存活 2 周以上。既然当上皮细胞形成铺满的单层时它们依靠紧密连接相联系，那么细胞实际上在内外室培养液之间形成了一个非通透性屏障。在我们的研究中其跨屏障净电阻(100~180$\Omega \cdot cm^2$)与其他报道相符，如 99±15$\Omega \cdot cm^2$[3]和 170$\Omega \cdot cm^2$[12]。值得注意的是，有许多因素影响电阻的测定，如准备(组织与培养的细胞)、温度、pH (生理溶液、培养液)、组织或细胞团的年龄以及培养液新鲜程度的差异。在我们的实验中，更高的 pH、更冷的培养液、更新鲜准备的细胞会引起更高的电阻读数。我们曾利用培养 8d 的血-CSF 屏障体外模型研究甲状腺素转运，证明铅(Pb)阻碍甲状腺素的跨上皮转运[4,5]。这可能是因为 Pb 对脉络膜丛产生和分泌 TTR 具有抑制作用[13,14]。最近，我们也利用此模型研究了血-CSF 屏障对铁的转运(资料未显示)。在这些实验中，我们观察到金属离子的跨上皮转运是一个相当缓慢的过程，有时需要 24h 才能达到平衡。短时间的研究可能会错过跨血-CSF 屏障恒定状态的物质转运。因此，一定要注意应花费足够的时间使物质转运达到恒定的平衡状态。

(6) 脉络膜上皮细胞的特征。因为已经反复证明 TTR 专一性地表达于脑脉络膜上皮[15,16]，所以用抗 TTR 抗体进行免疫组织化学染色，是鉴别其他来源细胞是否为脉络膜上皮的最可靠方法。由于缺乏商品化的抗 TTR 抗体，用 RT-PCR 测定 TTR mRNA 似乎是鉴别脉络膜上皮必不可少的途径。Dickson 等[7]首次报道了 TTR mRNA 的序列。我们以大鼠 TTR mRNA 的 RT-PCR 为目的设计了引物。此文所用的方法在我们培养的细胞、新鲜分离的脉络膜丛组织，以及肝脏 cytosolic 制备上都显示了良好的一致性。总之，对于不同来源的脉络膜上皮细胞培养的建立，已经有文献进行描述，包括小鼠[17,18]、大鼠[18~20]、兔[6]、绵羊[21]和奶牛[10,22]。其中有些效果较好，有些效果差些。我们在这里描述了简单且具重复性的大鼠、小鼠、兔的上皮细胞培养方法。培养具有相对一致的上皮细胞类型和少量的成纤维细胞污染。生长在 Transwell 用品上的上皮细胞在两个间隔之间形成铺满的上皮屏障。这个体外培养系统可用于血-CSF 屏障的生理学、生物化学、药理学和毒理学研究。

113

致谢

作者非常感谢哥伦比亚大学人类营养研究所的 William S. Blaner 博士惠赠 TTR 抗体。本研究由国家环境健康科学研究所提供部分资助。批准号：RO1 ES-07042 和 RO1 ES-08146。

(王希朝 译　戴博杰　段恩奎 校)

参 考 文 献

[1] Zheng, W. (2001) Toxicology of choroid plexus: special reference to metalinduced neurotoxicities. *Microsc. Res. Tech.*, **52**,89-103.

[2] Zheng, W. (1996) The choroid plexus and metal toxicities, p. 609-626. In *Toxicology of metals* (Chang, L. W ., Magos, L., and Suzuki, T ., eds.), CRC Press, New York.

[3] Southwell, B. R., Duan, W., Alcorn, D., Brack, C., Richardson, S., Kohrle, J., and Schreiber, G. (1993) Thyroxine transport to the brain: role of protein synthesis by the choroid plexus. *Endocrinology* **133**,2116-2126.

[4] Zheng, W., Zhao, Q., and Graziano, J. H. (1998) Primary culture of rat choroidal epithelial cells: a model for in vitro study of the blood-cerebrospinal fluid barrier. *In Vitro Cell. Biol. Dev.* **34**,40-45.

[5] Zheng, W., Blaner, W. S., and Zhao, Q. (1999) Inhibition by Pb of production and secretion of transthyretin in the choroid plexus: its relationship to thyroxine transport at the blood-CSF barrier. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **155**,24-31.

[6] Mayer, S. E. and Sanders-Bush, E. (1993) Sodium-dependent antiporters in choroid plexus epithelial cultures from rabbit. *J. Neurochem.* **60**, 1304-1316.

[7] Dickson, P. W., Howlett, G. J., and Schreiber, G. (1985) Rat transthyretin (prealbumin): molecular cloning, nucleotide sequence, and gene expression in liver and brain. *J. Biol. Chem.* **260**,8214-8219.

[8] Schreiber, G., Aldred, A. R., Jaworowski, A., Nilsson, C., Achen, M. G., and Segal, M. B. (1990) Thyroxine transport from blood to brain via transthyretin synthesis in choroid plexus. *Am. J. Physiol.* **258**, R338-R345.

[9] Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (eds.) (1989) *Molecular cloning*, p. 7.6-7.11. CSH Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

[10] Crook, R. B., Kasagami, H., and Prusiner, S. B. (1981) Culture and characterization of epithelial cells from bovine choroid plexus. *J. Neurochem.* **37**, 845-854.

114

[11] Kao, W. and Prokop, D. (1977) Proline analogue removes fibroblasts from cultured mixed cell population. *Science* **266**, 63-64.

[12] Saito, Y. and Wright, E. M. (1983) Bicarbonate transport across the frog choroid plexus and its control by cyclic nucleotides. *J. Physiol.* **336**, 635-648.

[13] Zheng, W., Perry, D. F., Nelson, D. L., and Aposhian, H. V. (1991) Protection of cerebrospinal fluid against toxic metals by the choroid plexus. *FASEB J.* **5**, 2188-2193.

[14] Zheng, W., Shen, H., Blaner, S. B., Zhao, Q., Ren, X., and Graziano, J. H. (1996) Chronic lead exposure alters transthyretin concentration in rat cerebrospinal fluid: the role of the choroid plexus. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **139**,445-450.

[15] Aldred, A. R., Brack, C. M., and Schreiber, G. (1995) The cerebral expression of plasma protein genes in different species. *Comp. Biochem. Physiol.* **111B**, 1-15

[16] Herbert, J., Wilcox, J. N., Pham, K. C., et al. (1986) Transthyretin: a choroid plexus-specific transport protein in human brain. *Neurology* **36**, 900-911.

[17] Bouille, C., Mesnil, M., Barriere, H., and Gabrion, J. (1991) Gap junctional intercellular communication between cultured ependymal cells, revealed by Lucifer yellow CH transfer and freeze-fracture. *Glia* **4**,25-36.

[18] Peraldi-Roux, S., Nguyen- Than Dao, B., Hirn, M., and Gabrion, J. (1990) Choroidal ependymocytes in culture: expression of markers of polarity and function. *Int. J. Dev. Neurosci.* **8**, 575-588.

[19] Strazielle, N., and Ghersi-Egea, J. F. (1999) Demonstration of a coupled metabolism-efflux process at the choroid plexus as a mechanism of brain protection toward xenobiotics. *J. Neurosci.* **19**,6275-6289.

[20] Tsutsumi, M., Skinner, M. K., and Sanders-Bush, E. (1989) Transferrin gene expression and synthesis by cultured choroid plexus epithelial cells. *J. Riol. Chem.* **264**, 9626-9631.

[21] Harter, D. H., Hsu, K. C., and Rose, H. M. (1967) Immunofluorescence and cytochemical studies of visna virus in cell culture. *J. Virol.* **1**, 1265-1270.

[22] Whittico, M. T., Hui, A. C., and Giacomini, K. M. (1991) Preparation of brush border membrane vesicles from bovine choroid plexus. *J. Pharmacol. Methods* **25**,215-227.

第11章　分化的人导气管上皮细胞原代培养模型

115

Philip H. Karp, Thomas O. Moninger, S. Pary Weber, Tamara S. Nesselhauf, Janice L. Launspach, Joseph Zabner, Michael J. Welsh

1　引言

1.1　导气管上皮

人类导气管上皮在内外环境之间形成了一道屏障，把空气与组织间隙分开，同时也行使其他多种功能。通过跨上皮电解质的主动转运，导气管上皮控制着覆盖上皮的导气管表面液体的组成和数量，且分泌多种物质到导气管表面液体中，包括 IgA 和抗微生物因子；这些物质组成了保护导气管和肺免受感染的防御屏障的一部分。其绒毛的活力对于黏膜纤毛的清除能力至关重要。当遇到环境因素或感染性物质侵害时，上皮参与炎症反应。它不仅对细胞因子和其他炎症物质前体、抗炎症物质有反应，同时也产生细胞因子和其他炎症物质前体、抗炎症物质。为了研究和理解人导气管上皮复杂而多样化的功能，研究者们已发展了上皮细胞培养模型。与体内研究相比，这些模型具有灵活、实验条件可控、可干预性更大等优点；也可以在其他细胞和组织(如巨噬细胞、黏膜下层腺体、成纤维细胞以及免疫系统细胞) 缺乏的条件下研究上皮的功能。相反，对于一些研究，有非上皮细胞和组织的存在可能会更具优越性。重要的是，在某些情况下，这些其他类型的细胞应能被加到上皮培养系统中。

116

覆盖着人类巨大的导气管表面的上皮是一种假复层上皮，也就是说，所有细胞都连接着基膜，但并非所有细胞都延伸到了腔的内表面。3 种最普通的细胞类型是纤毛上皮细胞、杯状细胞和基底层细胞。对细胞类型和形态的描述见 Wheater 等[1]的文章。在更为末梢的导气管中，上皮细胞不是高杆形，而是柱形，克莱拉(Clara)细胞则呈凸起状。软骨导气管在其上皮下结缔组织层中也包含黏膜下腺体。

本章描述了人的肺、鼻息肉及鼻甲骨分化的导气管上皮细胞收集和原代培养的方法。用酶离解导气管组织中的上皮细胞，然后接种到通透性膜支持物上。通过至少 3 种不同类型的细胞培养，发展成一种在胶原处理的膜上支撑着柱形细胞的假复层上皮。此导气管体外培养模型具有极化的上皮细胞，具有紧密连接和明显的顶部和底侧膜。仅利用底侧表面的培养液维持培养，顶部表面暴露于空气中。顶部膜表面会生长出微绒毛和纤毛，并覆盖以黏液。所以，此培养模型与人类体内导气管上皮相比表现出许多相似的特性。

1.2　分化的人导气管上皮原代培养的形态

此处描述的分化的人导气管上皮培养模型，显示了与体内导气管上皮相似的形态特征。为检查形态，应用了扫描电子显微镜(SEM)和透射电子显微镜(TEM)。图 11.1 显示

一幅人导气管上皮原代培养常规处理的顶部表面 SEM 图像。此图像显示了铺满排列的纤毛细胞(C)和微绒毛覆盖的杯状细胞(G)，这是体内导气管上皮的特征。

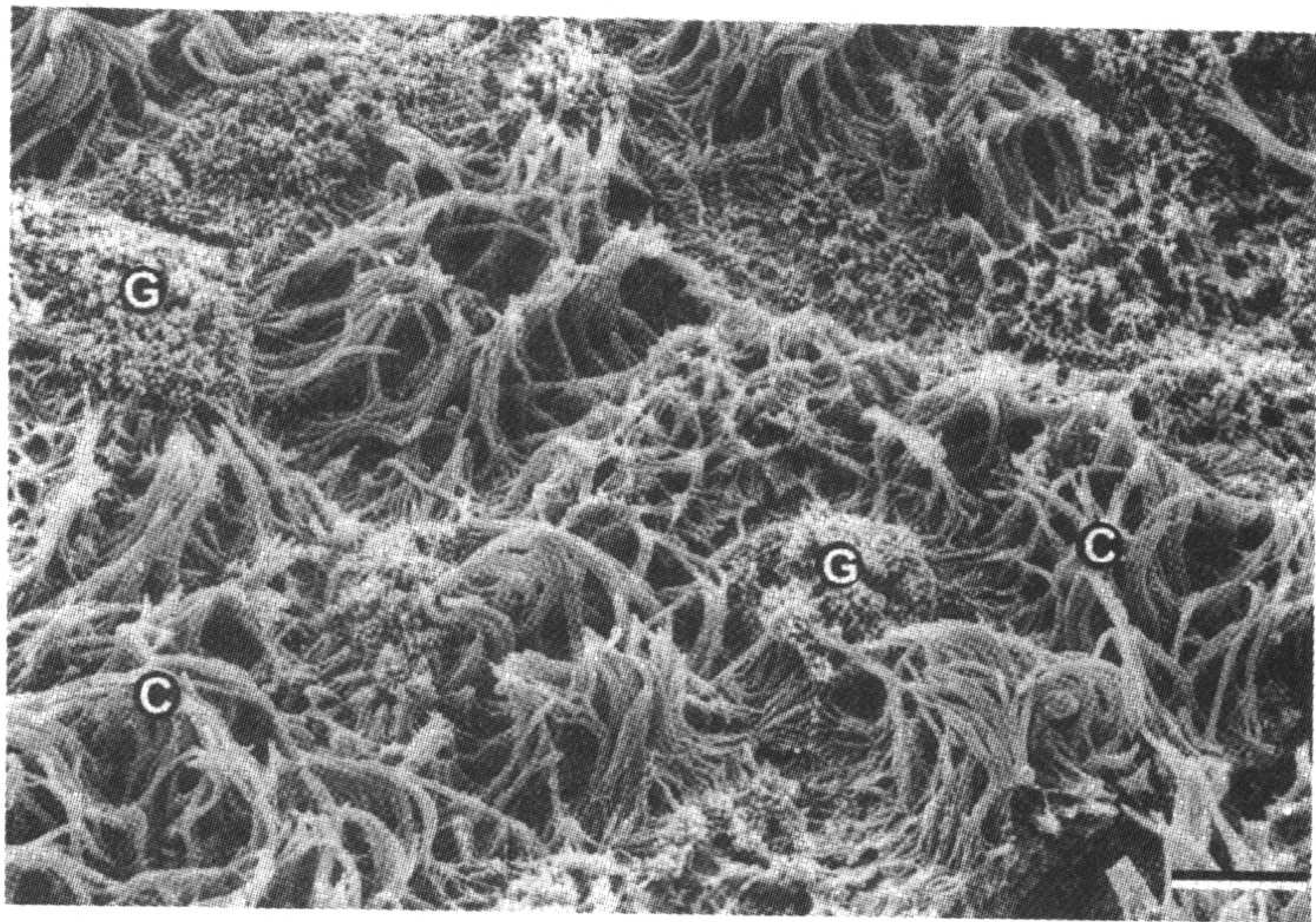


图 11.1　生长于半通透性滤膜上的分化的人导气管上皮，常规固定和处理的扫描电镜照片

可见纤毛细胞(C)和杯状细胞(G)。比例尺等于 5μm

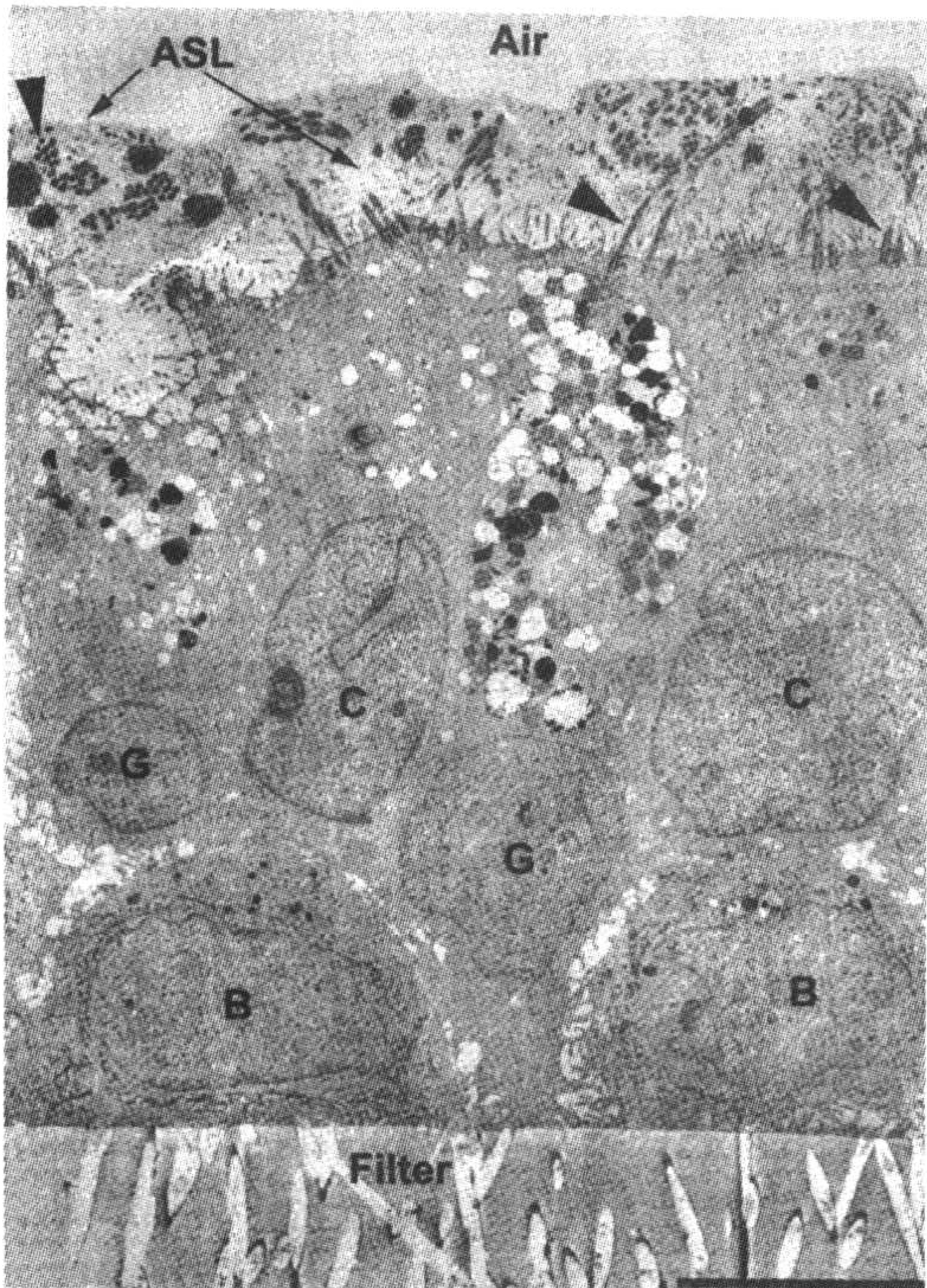


图 11.2　PFC/OsO_4固定的生长在半通透性滤膜上的人导气管上皮的透射电镜照片

标示的结构包括空气、滤膜、ASL、纤毛(箭头)、杯状细胞(G)、基底细胞(B)以及纤毛细胞(C)。比例尺等于 5μm(注　Air：空气；Filter：滤膜)

117

电镜常规处理(使用水基固定剂和缓冲液)的局限性在于，多数部位除去了导气管表面液体(ASL)和覆盖于上皮表面的黏液。使用少至 10μL 的盐水即足以解除培养的 ASL。为了更好的检查未变样的上皮培养的整体形态，包括 ASL，我们采用了 Thurston 等和 Sims 等[2,3]所首先描述的处理技术。此方法应用溶于全氟化碳的四氧化锇(PFC/OsO_4)作为固定剂，避免所有水性试剂。PFC 与水不相溶，不会干扰 ASL，只有 OsO_4 向 ASL 中自由扩散以稳定细胞形态。然后用几次 100%乙醇使培养的细胞脱水，过渡到 Eponate 12 环氧树脂并包埋进行 TEM 剖面处理，或过渡到六甲基二硅烷并风干进行 SEM 观察。

图 11.2 显示 PFC/OsO_4 处理的导气管上皮培养的 TEM 连续剖面图。形态显示典型的假复层上皮，ASL 覆层与人类自然的导气管组织中所发现的一样。可鉴别的细胞类型包括基底细胞(B)、杯状细胞(G)和纤毛细胞(C)。在 ASL 中可见纤毛(箭头)，并且有些纤毛与截面垂直。注意在杯状细胞中含有分泌

性囊泡，左边的细胞刚刚排出其大部分内容物。基部细胞和相邻的细胞之间有广泛的指状突起。滤膜中 0.4μm 的小孔可在照片底部看到。

图 11.3 显示 PFC/OsO_4 处理的导气管上皮培养的 SEM 图。视野中的这一面显示上皮培养的边缘，此处滤膜已被分离。上皮细胞层的顶部已被剥离，暴露出了基部细胞的皱表面(B)，其中一些仍然黏附于滤膜上(F)。滤膜中 0.4μm 的小孔也可看到(箭头)。值得注意的是，该图中有黏液层(M)，但在图 11.1 中观察不到。黏液覆盖在上皮(E)表面的纤毛(C)上。

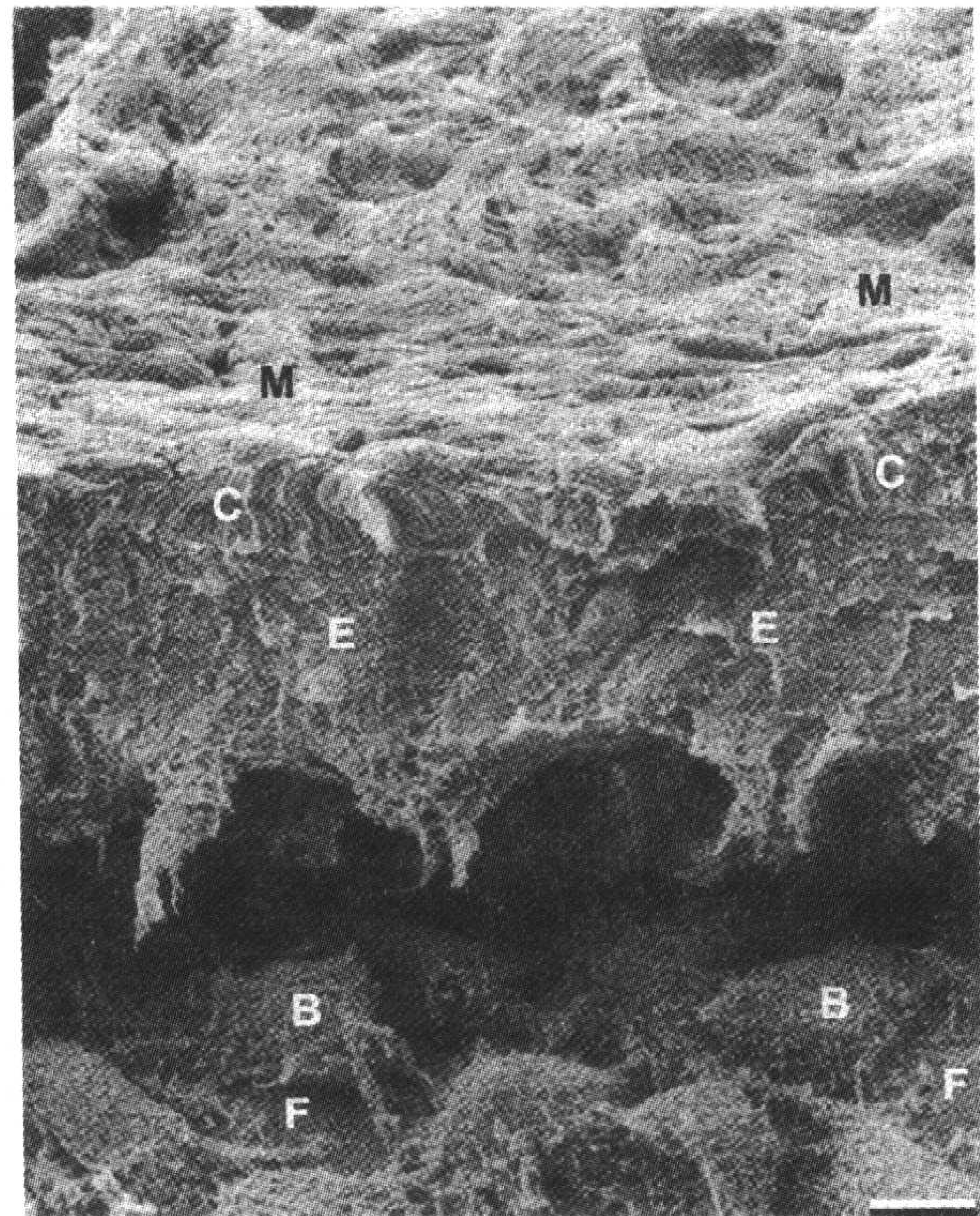


图 11.3　PFC/OsO_4 固定的分化的人导气管上皮扫描电镜照片

视野所见为滤膜的边缘，此处上皮与滤膜分离。标示的结构包括滤膜(F)、滤膜孔(箭头)、基底细胞(B)、纤毛(C)、上皮(E)和黏液层(M)。比例尺等于 5μm

1.3　分化的导气管上皮原代培养的用途　118

导气管上皮培养有多种用途。这里我们简要叙述几种。

1.3.1　跨上皮电解质转运的测量

可用放射性同位素衰变来估计跨上皮转运，或在 Ussing Chamber(Jim's Instrument，Iowa City，IA)中接种上皮来测量带电离子的转运[4]。图 11.4 展示了分化的导气管上皮短路电流测量事例。曲线表示阿米洛利(amiloride)敏感的 Na^+电流和 cAMP 刺激的囊泡纤维化跨膜电导调整器依赖的 Cl^-电流。　119

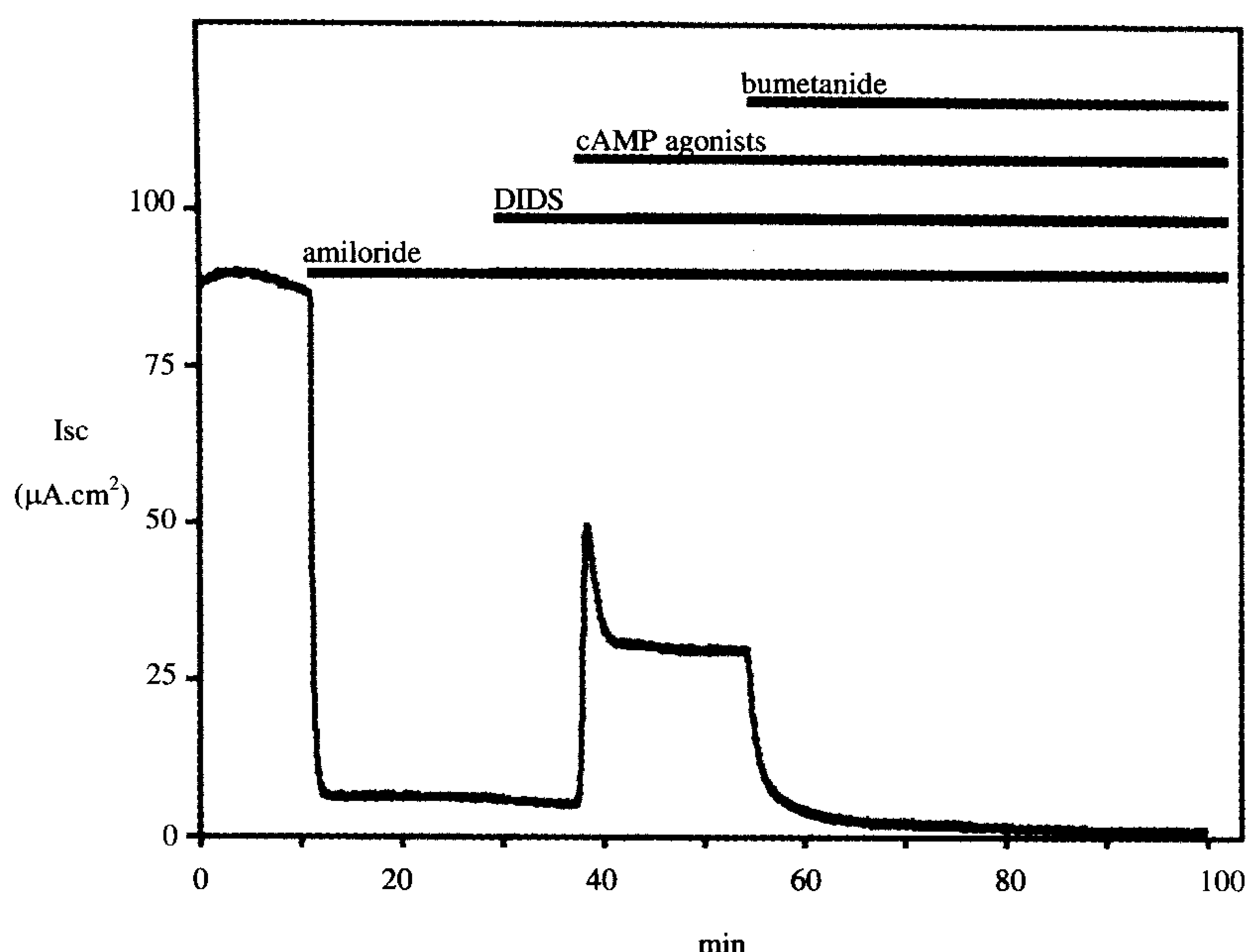


图 11.4　源于人支气管分化的导气管上皮原代培养的短路电流图例

曲线来源于接种在改进的 Ussing Chamber 中的上皮，在该上皮上连续测量了短路电流(Isc)(558C-5 电压箝位电路系统，Iowa 生物工程大学，Iowa City，IA)。上面的横杠表示所指混合物的连续加入。顶质阿米洛利(apical amiloride)(100μmol/L)抑制了顶质膜的 Na^+通道。加入 4，4′-二异硫代氰酸盐-2,2′-二磺酸(DIDS；100μmol/L 到顶质膜表面抑制了 Ca^{2+}激活的顶质膜 Cl^-通道。cAMP 拮抗剂佛氏可林(forskolin)(10μmol/L)和 3-异丁基-2-甲基黄嘌呤(IBMX；100μmol/L)导致顶质膜 CFTR Cl^-通道的磷酸化和激活。底侧加入布美他尼(bumetanide)(100μmol/L)抑制底侧 Na^+-K^+-$2Cl^-$的协同运输。上皮浸没在对称 Ringers 溶液中，该溶液含 135μmol/L NaCl、1.2mmol/L $CaCl_2$、1.2mmol/L $MgCl_2$、2.4mmol/L K_2HPO_4、0.6mmol/L KH_2PO_4、10μmol/L 右旋葡萄糖和 5mmol/L HEPES(用 10N 的 NaOH 调节 pH 至 7.2)。此 Ussing 小室沐浴溶液用 100% O_2 连续充气使之起泡

1.3.2　对病毒和非病毒载体转基因的评价

转基因对囊肿性纤维化(CF)和其他遗传性/获得性疾病提供了新的治疗方案。但是，当移除顶部表面后，许多公认的载体是无用的。分化的导气管上皮体外研究被证明是一种理想的模型，用它可研究这些载体失效的机制。例如，图 11.5 表明 2 型和 5 型腺病毒受体载体、柯萨奇病毒-腺病毒受体(CAR)均定位于上皮的底侧表面，此处不能接触到顶部所用的载体[5]。培养的上皮细胞为改进转基因技术提供了非常有用的模型[6]。

1.3.3　检验和开发新药物的模型

许多药物经导气管运送，常见的如气雾剂。上皮培养可提供一个系统，用它研究药物对上皮的作用[7]。它也可用于估计试剂通过上皮向平滑肌、间质以及最终到循环系统的运动。反之亦然上皮可用来评价试剂从底侧面向顶部表面的运动。一个有趣的例子是用聚合的免疫球蛋白受体使试剂从疏松结缔组织向结缔组织表面穿梭[8]。

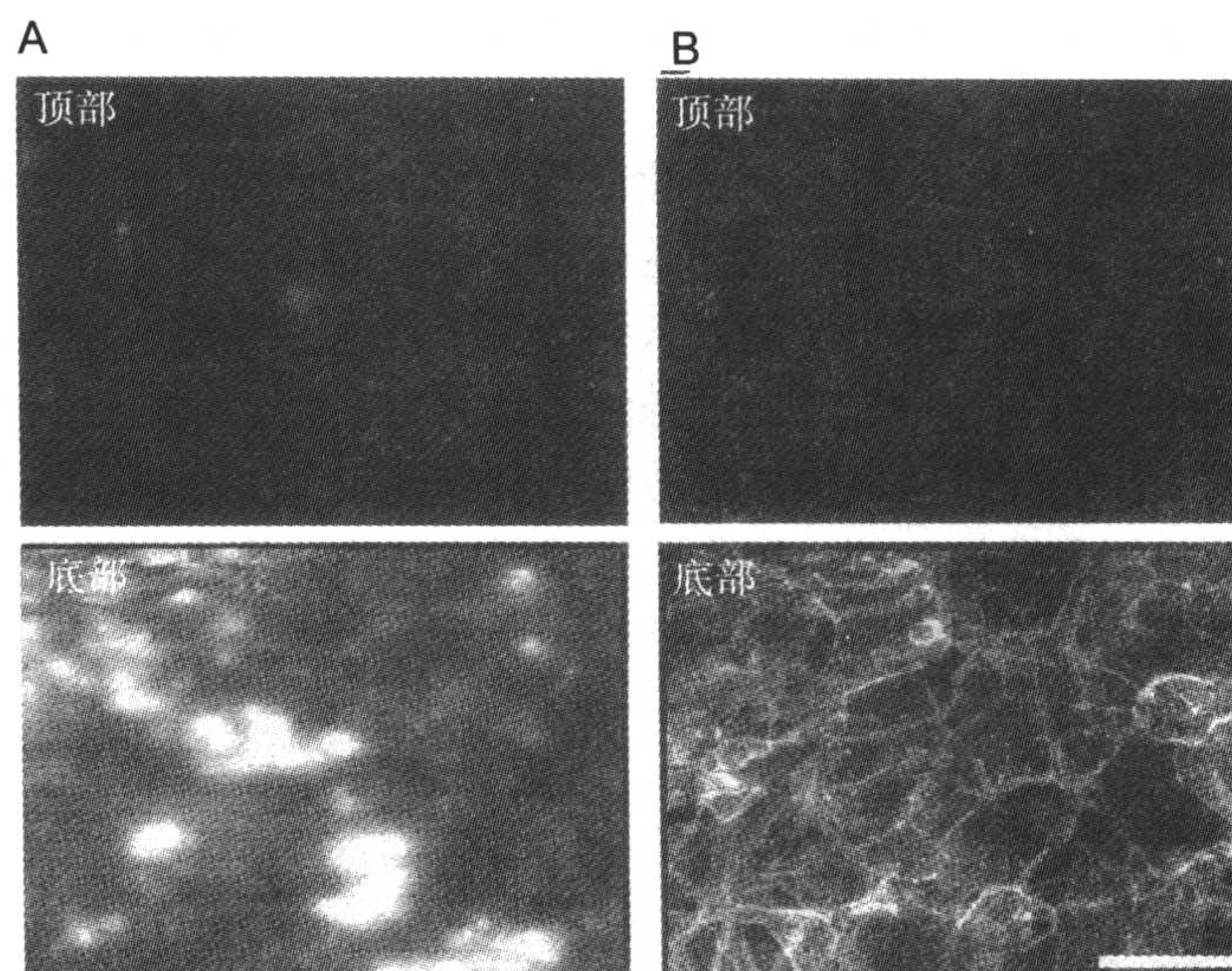


图 11.5 免疫细胞化学法评估 CAR 和 I 类主要组织相容复合体(MHC)在高度分化的人导气管上皮中的表达

(A)用抗 CAR 单克隆抗体和异硫氰酸荧光素(FITC)标记的二抗在顶部或底侧面孵育非通透性上皮的免疫细胞化学照片。上面的照片表明顶质膜没有 CAR 染色。下面的照片表明多数细胞呈低密度染色，少部分细胞呈高密度染色。(B)用 FITC 标记的抗 I 类 MHC 单克隆抗体在顶部或底侧面孵育非通透性上皮的照片。上面照片表明顶质膜没有 I 类 MHC 染色，下面照片表明在所有细胞上均有高密度染色。比例尺等于 50μm。授权引用自参考文献[5]

1.3.4 疾病发病机制的模型

分化的导气管上皮为研究获得性和遗传性疾病的发病机制提供了一种理想的模型。以 CF 患者细胞所产生的上皮细胞为例，研究表明，上皮可产生能杀死少量细菌的防御系统，而此防御系统在 CF 患者身上缺乏[9]。

1.3.5 导气管上皮与环境因素相互作用的模型

导气管经常暴露于污染物、有毒物质和微生物中。分化的导气管上皮提供了一个灵巧的实验模型系统，用它可评估其相互作用。例如，其中的受体和细胞因子信号网络在炎症中发挥着关键作用。

1.4 人导气管上皮原代培养的发展

此处介绍收集和培养人导气管上皮作为导气管体外模型所要求的方法和技术，而重点是原代培养，因为它能可靠地产生与体内导气管上皮相似的功能和形态。人们并不能使最初来源于导气管的细胞系始终如一地保持这些特征，即使经过很少的几次传代，也能发现细胞的表现型发生了改变。所以，一个好的模型系统总是要求尽力与原代培养相联系。特别对那些导气管上皮的研究者来说，当必须使用一种模拟导气管上皮的模型时，此处介绍的上皮可能是非常有用的。但是，有些实验并不需要这样的模型。当发生这种情况时，其他省力省钱的细胞和方法即可满足要求。

此处介绍的方法和步骤是从 M. Yamaya 等 1992 年[10]首先报道的方法中改进而来的。所以，我们对他们开创性的工作表示感谢。大幅度改进后的培养方法，使我们能够在更短的时间内收集到大量的细胞，并且使分化的导气管上皮保持几个月的活力。此改进也提高了培养跨上皮转运的特征。我们认为这些培养上皮的进步既是科学的、又是艺术的进步。对于标准化的目标而言是科学的，人们改变了技术、经验、判断从而产生出足够巧妙的培养，因而是艺术的。另外，此处描述的培养方法是“正在进行的工作”。未来的研究会进一步发展我们在这里所描述的方法。我们建议，一个正在培养这些上皮细胞的人要愿意尝试新的培养液添加剂、黏附底物或膜支持物。当进行这些工作时，要将培养结果与标准步骤的结果相比较。

123

2 材料

(1) 杜氏磷酸盐缓冲液(PBS)，无 Ca^{2+}、Mg^{2+}(Sigma，cat. no. D5773)。在 4℃储存一份 PBS，用于冲洗手术标本。室温下储存另外一份用于冲洗 Millicell 膜载体。

(2) 含 Ca^{2+}、Mg^{2+}的杜氏 PBS(Sigma，cat. no. D5780)。4℃冷藏，用于运送手术标本。

(3) 分离器械。

a. 中等尺寸的直刃分离剪刀。

b. 细齿组织镊子(Graefe Tissue Forceps, Biomedical Research Instruments, Rockville, MD,cat. no. 30-1680)。

c. 带有塑料衬垫的塑料盘，用于放置湿冰上冷却的肺以及分离时盛放溢出物。

(4) 无 Ca^{2+}、Mg^{2+}分离溶液：即最低基础液(MEM)。此溶液按配方配制，每升去离子水中含有：400mg KCl，6400mg NaCl，3700mg $NaHCO_3$，125mg $NaHPO_4 \cdot H_2O$，15mg 酚红，110mg 丙酮酸钠，100 000U 青霉素，100 000μg 链霉素，室温下用几滴浓 HCl 调节溶液 pH 至 7.5。使用 0.22μm 滤膜真空过滤除菌。4℃可保存数月。

(5) 分离酶溶液。分离酶溶液中使用两种酶：链霉蛋白酶(Roche/Boehringer Mannheim，cat. no. 165921)，应保存于 4℃；脱氧核糖核酸酶 1(Sigma，cat. no. DN-25)，0℃以下冻干保存。100 mL MEM 中应溶解 140mg 链霉蛋白酶和 10mg 脱氧核糖核酸酶 1。

(6) 胎牛血清(FBS)(Hyclone，cat. no. SH30070.03)。不必热灭活血清以弃掉其中的补充物。另外，不采用热灭活会更好，因为这样不会影响血清中营养因子的潜能。使用 0.22μm 滤膜过滤除菌，除去沉淀，4℃保存。

(7) DMEM 培养液，高糖(Life Technologies，cat. no. 12800082)，4℃保存。

(8) Ham’s F12 营养混合剂(Life Technologies，cat. no. 21700091)，4℃保存。

(9) Ultroser G 添加剂，一种血清替代品(Biosepra SA，Cergy-Saint-Christophe，France，cat. no. 259516 或 259515，美国销售商 Crescent Chemical，Islandia，NY 11749)，4℃保存。(美国进口需要 A USDA 进口许可证，VS 16-3 申请表可从以下网点下载：http://www.aphis.usda.gov/NCIE/)。

124

(10) 导气管培养液 1。此培养液只用于细胞接种和细胞培养当天，其组成为：1:1 的 DMEM 和 Ham’s F12，添加 5% FBS(不用热灭活)和 1% MEM 非必需氨基酸溶液(Life Technologies，cat. no. 11140-050)。

(11) 导气管培养液2。此液在培养1天后连续应用。其组成为1∶1的DMEM和Ham's F12，添加2% Ultroser G。

(12) 冷冻液：40% FBS，50%导气管培养液 1，10%二甲基亚砜(DMSO)。

(13) 培养抗生素：向两种导气管培养液中常规加入青霉素(100U/mL)和链霉素(100μg/mL)(Life Technologies, cat. no. 15140-122), 庆大霉素(50μg/mL)(Life Technologies, cat. no. 15750-060)，fluconazole(2μg/mL)(Diflucon；Pfizer)和两性霉素 B(1.25μg/mL)(Sigma，cat. no. A9528)。培养几天后，抗生素的浓度可以降低，或者抗生素的种类可以减少或不用抗生素。对于长期维持培养来说，联合应用 fluconazole 和两性霉素 B 对于防止和控制酶液的污染特别有效。对于来源于 CF 的导气管上皮细胞培养，在最初培养 5~6d 内添加另外的抗生素。这些抗生素是：77μg/mL 头孢他啶(Fortaz；GlaxoWellcome)，2.5μg/mL 结肠杆菌素(Coly-Mycin；Monarch Pharmaceuticals)，12.5μg/mL imipenem 和 cilastin(Primaxin；Merck)。但在培养液中长期加入 imipenem 和 cilastin 会伤害上皮细胞。

(14) 有助于黏附和增殖的培养底物。

a. 60μg/mL 来源于人类胎盘的 VI 型胶原，可溶解于酸(Sigma，cat. no. C-7521)。0℃以下冻干保存，直到重新使用。常用此胶原作为通透性膜支持物和塑料表面首推黏附因子。从 Sigma 的多种胶原中筛选出了少量胶原，因为有些胶原在膜支持物上培养效果比较差。然后订购了大量的想要的胶原，并且−20℃保存长达 18 个月。

b. 备选的底物：Vitrogen 100，牛皮肤胶原(Cohesion Technologies，Palo Alto，CA，cat. no. 0701)。按照制造商提供的说明做准备。此底物可在通透性膜支持物上形成凝胶状支持表面。

(15) 可选用的物质：100ng/mL 角化细胞生长因子(R & D Systems，cat. no. 251KG-010)。

(16) 上皮培养通透性膜支持物。

a. Millicell-PCF 膜载体，孔径 0.4μm，直径 12 mm(Millipore，cat. no. PIHP 01250)。Millipore 也制造相同的 30mm 直径的 PCF 膜载体(cat. no. PIHP 03050)。

b. 选择性应用。培养板载体上的透明膜可以用替代品：Costar-Transwell-Clear，孔径 0.4μm，直径 6.5mm(Costar，cat. no. 3470)。Costar 制造直径 12mm 的相同清洁级 Transwell 膜(cat. no. 3460)。应当注意，不同批次的底物支持成功培养的能力有差异。

(17) Falcon Primaria 100mm×20mm 组织培养皿(Becton Dickinson Labware，cat. no. 353803)。收集的细胞在通透性膜支持物上接种之前，要在此塑料表面孵育以除去成纤维细胞。

125

(18) Costar 24 孔细胞培养板(Costar，cat. no. 3524)。为了让 CO_2 平均接触到 24 孔培养板中所有的 Millicell 载体，我们优先选择了 Costar 商标。

(19) 灭菌的 15mL 和 50 mL 聚丙烯锥形管(Falcon，cat. no. 352098、352097)。

(20) 150mm×75mm 结晶杯(Fisher Scientific，cat. no. 08-762-9)。

(21) 血细胞计数器(Fisher Scientific，cat. no. 02-671-5)。

(22) 为了测量生长在通透性膜支持物上的导气管上皮的跨上皮电阻，推荐使用 Millicell-ERS 电压计(Millipore MERS，cat. no. 00001)。上皮完整性可用一个便携式仪器

进行定量估计，且不会影响无菌性或损伤膜上的细胞。

3 方法

3.1 人导气管组织的收集和分离

人导气管组织的良好活力，对于上皮细胞的顺利收集和随后把它们作为极化上皮来培养都很重要[见注意事项(1)]。通常用人供者的肺，有时也用鼻息肉和鼻甲骨作为新鲜标本。在手术切除后，标本应立即放入灭菌的冷生理盐水中，或冷的具 Ca^{2+}、Mg^{2+}的 PBS 中，或冷的 DMEM 中冷却，然后装在密封的容器中放在湿冰上运往实验室。在分离过程中标本应一直保持冷却状态。

(1) 在理想的无菌和安全条件下，分离最好在层流超净台中进行。操作者应始终戴灭菌手套进行操作。处理人类组织或进行导气管的原代培养时，操作者可能会接触到血源性病原，应当采取适当的健康保护措施。

(2) 把分离的组织块直接放入 15mL 或 50mL 灭菌的聚丙烯管中进行随后的处理或储存。

(3) 在 50mL 或 15mL 灭菌的管中，用冰冷灭菌的无 Ca^{2+}、Mg^{2+}的 PBS(也可加入抗生素)冲洗鼻息肉和鼻甲骨，以除去血液、黏液和碎片。

(4) 如需要，鼻组织标本可以在皮氏培养皿中剔除黏附的黏液和纤维组织。可能要用 PBS 冲洗几次以除去血凝块。

(5) 转移标本至灭菌的 50mL 或 15mL 管中，内含无 Ca^{2+}、Mg^{2+}的分离液溶解的分离酶。无二价阳离子的溶液有助于细胞的分离。

(6) 肺导气管组织包括气管、主干支气管以及在肺泡部重复分支的肺叶支气管。我们分离的是支气管到第三分支之间的一段[见注意事项(2)]。

126

(7) 未经处理的气管和支气管(含上皮、平滑肌和软骨)应用剪刀将其与外部连接的组织相分离，并切成长度为 2~4cm 的短段。直径较小的气管段应沿其长轴切开，尽量暴露其内腔。

(8) 把这些短段放入盛有冷 DMEM 的聚丙烯管中。

(9) 用无 Ca^{2+}、Mg^{2+}的 PBS 冲洗数次以除去内腔中的血液、黏液和化脓性物质。

(10) 导气管短段可浸入冷的无 Ca^{2+}、Mg^{2+}的 PBS 中 1h 有助于弃掉血凝块。然后把短段转移到一个新的含冷分离液的 50mL 或 15mL 聚丙烯管中。

(11) 根据导气管区域和突起，把不同的短段分装在不同的管中，因为不同的导气管分支的上皮活力可能不同。

(12) 为了防止上皮发生畸变，在处理过程中要防止标本温度的变化过大，这一点很重要。

3.2 分离和收集

(1) 在使用当天准备分离液。把两种酶，即链霉蛋白酶和脱氧核糖核酸酶溶解于事先准备好的无 Ca^{2+}、Mg^{2+}的 MEM 储液中[见 2 材料中的步骤(4)]。100mL MEM 溶液中溶解 140mg 链霉蛋白酶和 10mg 脱氧核糖核酸酶。摇动使酶溶解，然后在溶液中通入含

5% CO_2的空气或 95%O_2使溶液达到最佳 pH。方法是用从气体罐引出的管道，给封口膜覆盖的烧杯中的溶液充气数分钟。然后用 0.22μm 滤器过滤除菌，转移到一个新的灭菌的 50mL 或 15mL 的聚丙烯管中。

(2) 在盛有酶分离溶液的管中 4℃储存分离的标本 24~96h。分离期间有时需要倒置离心管以搅动和破碎细胞团。

(3) 鼻组织可分离 24~48h。气管和支气管组织最短需要 40h，最长 96h。分离时间根据分离成单细胞、细胞团的程度而定[见注意事项(3)]。

(4) 每份消化中的组织都可放置于载玻片上用显微镜观察，估计随时间变化时细胞成团块的程度。

(5) 在分离末期，在分离液中加入 10%(*V/V*)的 FBS。倒置离心管数次以搅动细胞悬液。

(6) 用吸管转移收集的细胞至新的聚丙烯管中。

(7) 用冷的灭菌 DMEM 或 Ham's F12 冲洗组织段以收集其余的细胞。

(8) 120*g* 离心细胞悬液 5min。

(9) 用含有抗生素的导气管培养液 1(含 5%胎牛血清)37℃重新悬浮细胞团块。再用一个灭菌的短径巴斯德吸管轻轻抽吸以破碎细胞团块。注意动作要轻柔。收集的细胞悬液中含有单细胞和多细胞团块。

(10) 用吸管转移细胞悬液至一个 Primaria 组织培养皿中。可选用细胞过滤器过滤掉大细胞团块和组织碎片[见注意事项(4)]。

127

(11) 在 CO_2 培养箱中 37℃孵育细胞悬液至少 1h 以上。此孵育可令细胞悬液中的成纤维细胞黏附于塑料表面。如果不用胶原预处理，导气管上皮细胞就不会黏附于塑料表面。我们发现 Falcon Primaria 组织培养塑料制品具有良好的成纤维细胞黏附性。不同的肺标本其导气管细胞悬液中成纤维细胞数目不同。偶然地，如果标本产生了高密度黏附的成纤维细胞，则需要用一个新的 Primaria 培养皿进行第二次孵育。如果第二次孵育时接种悬液中出现太多的成纤维细胞，它们与上皮细胞一起黏附于通透性膜支持物上，成纤维细胞就会阻碍上皮细胞形成具有良好的跨膜电阻，因为其中混杂了不会形成紧密连接的成纤维细胞克隆。

(12) 上皮细胞的总产量依赖于组织活力和大小。成年的一个带有气管和 2 或 3 个支气管的肺可以产生的上皮细胞数目介于 5×10^7 和 2×10^8 之间。

3.3 底物的准备

如果不进行表面预处理，多数导气管上皮细胞不会黏附于 Millicell 膜上。我们使用人类胎盘胶原溶液(60μg/mL)铺培养皿 Millipore PCF 膜载体的顶部至少需要 18h。室温下胶原溶液可以在 24 孔板中的膜支持物(直径 12mm)上储存数天。

(1) 50mL 去离子水中加入 30mg 胶原和 100μL 冰醋酸。

(2) 用封口膜覆盖烧杯，37℃下轻摇直到胶原颗粒完全溶解。在磁力搅拌器上放置一个结晶杯，内含温水(加热至 37℃，大约每 5min 更换一次)，做成一个摇动的水浴。溶解胶原需要的时间差异较大。通常 15~20min 即足以溶解胶原。

(3) 用去离子水 1∶10 稀释经过过滤的胶原储液，此液为包被塑料和膜表面的工作

液(60μg/mL)，可于玻璃瓶中 4℃保存数周。

(4) 0.2μm 滤膜过滤除菌。如果滤膜很快阻塞，则说明胶原颗粒未充分溶解。

(5) 室温下用胶原包被膜表面至少 18h。胶原可提高细胞黏附和增殖效率。紧急情况下可缩短包被时间。室温下液体胶原可在膜上保持几天时间。

(6) 接种当天，弃掉表面的液体胶原，风干膜表面。

(7) 用灭菌的 PBS 或 DMEM 冲洗膜支持物的两面至少 2 遍。一定要彻底弃掉液体胶原。剩余的液体胶原可能对细胞有毒。

128 (8) Vitrogen 凝胶是一种替代底物，在接种前涂布于膜的顶部。此物质有其优点和缺点。优点是在其上柱形细胞长得很高。缺点在于，由于凝胶容易破碎，使维持和使用稳定的导气管培养更加困难。

3.4 在膜上接种细胞

(1) 从含有导气管上皮培养液 1(5% FCS)的孵育皿中除去非黏附的细胞后，对细胞计数以确定细胞密度。

(2) 我们推荐使用血细胞计数室手工计数，在显微镜下观察细胞悬液。细胞悬液中取出一小部分，在高倍(400×)下观察，可对导气管上皮细胞的活力和均一性做出判断。如果悬液中出现数量可观的细胞团块，则用血细胞计数室计数可能会低估细胞数目。盖玻片可防止大团块均匀地覆盖在栅格区。一个补充的方法是，在载玻片上稀薄地涂抹一小份悬液，可观察到细胞悬液中团块所代表的程度。我们在对细胞悬液计数时即包括了大团块的“欺骗因素”。团块程度越高，用血细胞计数室计数得到的接种体积就越小。细胞悬液可能是异质性的，变化于单细胞和多细胞范围内。细胞悬液中可能会偶然地混有其他非上皮细胞，包括血红细胞。

(3) 按照血细胞计数器制造商提供的说明，在 400× 只计数上皮细胞，其特征是具有明显阴暗的细胞膜外观和非柱状外形。外观苍白的细胞、膜破损的细胞以及空细胞都不计数。纤毛不动的细胞也不计数。具有光环状外观的细胞是血红细胞不计数。估计出每个团块的上皮细胞数，计算出总的上皮细胞数。

(4) 在进行人导气管上皮细胞原代培养时，应用台盼蓝排除法估计非活力细胞并不适当。除非对解冻的活细胞进行计数外，一般并不推荐依赖染色法精确估计细胞活力。

(5) 最好根据你的手动计数方法尝试接种密度范围，直到你可以轻松地精确计数，而且可以根据随后在膜支持物上导气管培养成功地铺满来修正计数时为止。我们使用的接种范围是在 Millicell 载体上每平方厘米 2.5×10^5~5×10^5 个上皮细胞。如果收集的细胞悬液中含有比“正常”情况多的团块时，则可在较低的密度接种。混合有细胞团块时比单细胞的黏附效率要高，特别是混有纤毛细胞时更是如此[见注意事项(3)]。原代上皮细胞适当接种密度的确定，需要实验-误差的经验。细胞悬液中血红细胞的出现并不会干扰上皮细胞的黏附。

129 (6) 接种在通透性膜载体(直径 12mm)顶部的细胞悬液需要足够的体积，100~400μL 可保证细胞均匀地分布于膜表面。膜载体下方液体体积应该足够(250~500μL)，以浸透膜底面又不至于使载体漂浮。

(7) 接种后，应确定膜支持物是水平的，以保证第一个 12h 内均匀的细胞黏附。我

们使用 24 孔培养板来支持 12mm 的膜载体。也可使用 6 孔板，支持直径 24~30mm 的大载体。

(8) 在 CO_2 培养箱中 37℃、8%~9% CO_2 条件下，静置培养含有接种后膜支持物的培养板最少 18~24h[见注意事项(6)]。高 CO_2 浓度可提高铺满成功率，特别是 CF 导气管的培养。

(9) 接种 1d 后，用导气管培养液 2(2% Ultroser G)更换导气管培养液 1(5% FCS)。

(10) 用真空泵除去上部培养液，用导气管培养液 2 洗膜表面上部一次，除去未黏附的细胞。

(11) 然后从膜表面上部(空气界面)除去培养液，以便培养液只存在于膜载体底部。当细胞在空气界面生长时，它们依赖紧密连接形成一个铺满的单层，其上没有可见的液体。空气界面使铺满的细胞层成为一个良好的屏障，把上部的空气和浸泡着底部的液体分开。此空气界面的条件等同于体内导气管上皮空气覆盖的表面。

(12) 每天从表面弃掉一次所有的液体，使膜培养保持可见的干燥顶部；此情况通常发生于 8%~9% CO_2 条件下接种后的 3~6d。在培养的前几天，铺满的细胞层尚未形成，通常会发生培养液渗过膜的情况，直到细胞增殖达到铺满。

(13) 在整个培养期间要在膜载体底部维持导气管培养液 2，以防止培养干燥和细胞死亡。

(14) 细胞达到铺满后，有极性的上皮细胞层会在其顶部调节最少的液体和内容物。液体的量是如此之少，以致肉眼不能看到。

(15) 要冻存原代导气管上皮细胞时，细胞悬液要用冷冻液重新悬浮。冻存管在−70℃下冷冻 4~24h，然后转移至液氮长期保存。

(16) 以后要使用时，用 37℃水浴解冻冻存管，用导气管培养液 1 洗涤。

(17) 离心并用导气管培养液 1 重新悬浮细胞团。最高可能达到 70%的活力。

3.5 常规培养与长期维持

两个细胞培养条件有助于膜支持物上有极性的人导气管上皮细胞保持长期的活力。含 2% Ultroser G 的导气管培养液 2 和顶部空气界面联合作用，可令上皮保持数月的活力。我们的资料显示，上皮在培养大约 14d 后，可能就不再继续分化。长时间培养的维持不但是经济的，而且对应用上皮的实验具有时间安排的灵活性。我们在膜支持物上维持有活力的导气管上皮长达 15 个月。在此期间，上皮保持了空气界面和跨膜电阻。如此长时间的保持，对于应用病毒或非病毒质粒调节的基因转化法转化的基因表达持续性的研究，具有特殊的价值。

130

(1) 培养 4~6d 之后，一旦细胞维持了空气界面，将保持在 5% CO_2、潮湿空气、37℃条件下完成培养的其余部分。

(2) 从接种的第 1 天开始，表面上的液体必须每天弃掉，直到上皮铺满并维持空气界面。长时间的活力要求膜顶部具有空气界面。

(3) 据估计有 50%~70%接种的导气管细胞在接种后 12h 内可黏附于胶原包被的膜表面。细胞继续繁殖直到接种后 7~9d。到第 9 天，$0.6cm^2$ 膜表面上应平均具有 650 000~750 000 个导气管上皮细胞。此后细胞数量会保持相对恒定，除非在基底细胞培养液中加

入像角化细胞生长因子(KGF)那样的生长因子启动了细胞增殖。

(4) 细胞培养液酸化的比率变化依赖于培养的时间。刚开始培养时要求每 2~3d 更换一次培养液。后期培养要求每 5~7d 更换一次培养液。每当培养液变得过酸，即外观上呈黄色时应更换。当更换培养液时应注意不要使吸管的尖端接触膜表面，以免损伤上皮、降低跨膜电阻。

(5) 数周和数月维持培养的最大考验是防止可能的病原特别是酵母菌的感染。我们发现，联合应用 fluconazole 和两性霉素 B 两种杀真菌剂，对预防或限制开始感染后的指数生长期具有特效。如果实验方案有要求，在时间延续期间，降低抗生素浓度或完全弃掉抗生素也是可行的。我们在培养液使用前，放在滤膜覆盖的细颈瓶中在 CO_2 培养箱中预孵育，目的是屏蔽任何培养液原料的污染。特别是对于长达一年的培养，我们利用两个或更多的 CO_2 培养箱对来源于同一个样品的上皮进行不同的实验，目的是“降低”由于培养箱故障或机械问题而引起的“风险”。在每次更换培养液之前，都要检查每一个培养上皮的孔，培养液中出现污点或呈云雾状都是污染的标志。我们也采用改变培养液更换天数的办法，降低从一个污染的培养发生交叉污染的概率。

131

(6) 导气管培养液 2 只出现在底表面，则导气管上皮可长期维持。如果实验方案要求某些添加剂缺乏，那么在 50/50 DMEM 和 Ham's F12 培养液中不添加 Ultroser G 时，上皮可维持数日的活力。

(7) 对某些特殊需要，可在培养液中添加额外的添加剂。例如，为遏制铺满后细胞的增殖，在接种后 8~10d 期间，使用角化细胞生长因子 24~48h。

3.6 导气管上皮的评价

(1) 培养的评价对于鉴别细胞是否具有导气管上皮表现型特别重要。在培养过程中，必须使用数种方法不断地检查细胞。

(2) 例如，检查顶表面是否为干燥外观。对每组培养的跨上皮电阻(*R*t)和形态进行常规检查。

(3) 我们测量 Ussing 孔中每个导气管样品的 *R*t、跨上皮电压、amiloride 敏感的 Na^+ 电流、CFTR 依赖的 Cl^-电流，以研究一些上皮培养。

3.6.1 跨上皮电阻

这里简要介绍 *R*t 的测量和形态学评价。对 Ussing 孔中跨上皮电特性的测量将不做描述。若要充分了解这方面的步骤，读者可参考文献[12]和[13]。

(1) 利用便携的欧姆计可方便地监测 *R*t。我们使用的是带有双“细长”电极的电压计。

(2) 每一个电极的柱上都在其尖端含有一个用来测量电压的 Ag/Ag Cl^-电极和一个测量跨上皮通过电流的银质同心螺旋。

(3) 使用前把电极尖端在 70%乙醇中消毒，以维持细胞培养的无菌性。

(4) 为测量电特性，在顶部表面放置 300~400μL 的导气管培养液 2。测量后弃掉。

(5) 用一个如 Millipore PCF 那样的培养膜载体，把较短的电极尖端放入上表面的顶部，把较长的电极尖端放入沐浴培养液的外部液体中。

(6) 然后电流就可跨越上皮，以测量 Rt。Rt 值高于背景液体时就表明导气管上皮通过紧密连接形成铺满。

(7) 在我们的经验中，发现在研究 Ussing 孔中的上皮时，这种方法测得的 Rt 值总是高于更精确的测量得到的值。此差异至少部分地是由于 Ussing 孔中跨上皮电流的分布更均匀。相反，使用细长电极，电流的分布可能受空间制约，而与上皮通透性无关。我们比较了 Milliproe ERS 电压计测量的 Rt 值和 Ussing 孔中电压-箝位电路测量的 Rt 值。数据如图 11.6 所示。在两种情况下，液体电阻和滤膜电阻都被减掉，测量值都修正为上皮区域值。其关系可用下面的公式描述：

132

$$Rt(\text{Ussing 孔})=[0.492\times Rt(\text{细长})]+158$$

当用细长电极测量，没有修正区域和液体电阻时，其关系可用以下公式描述：

$$Rt(\text{Ussing 孔})=[0.295\times Rt(\text{细长})]+107$$

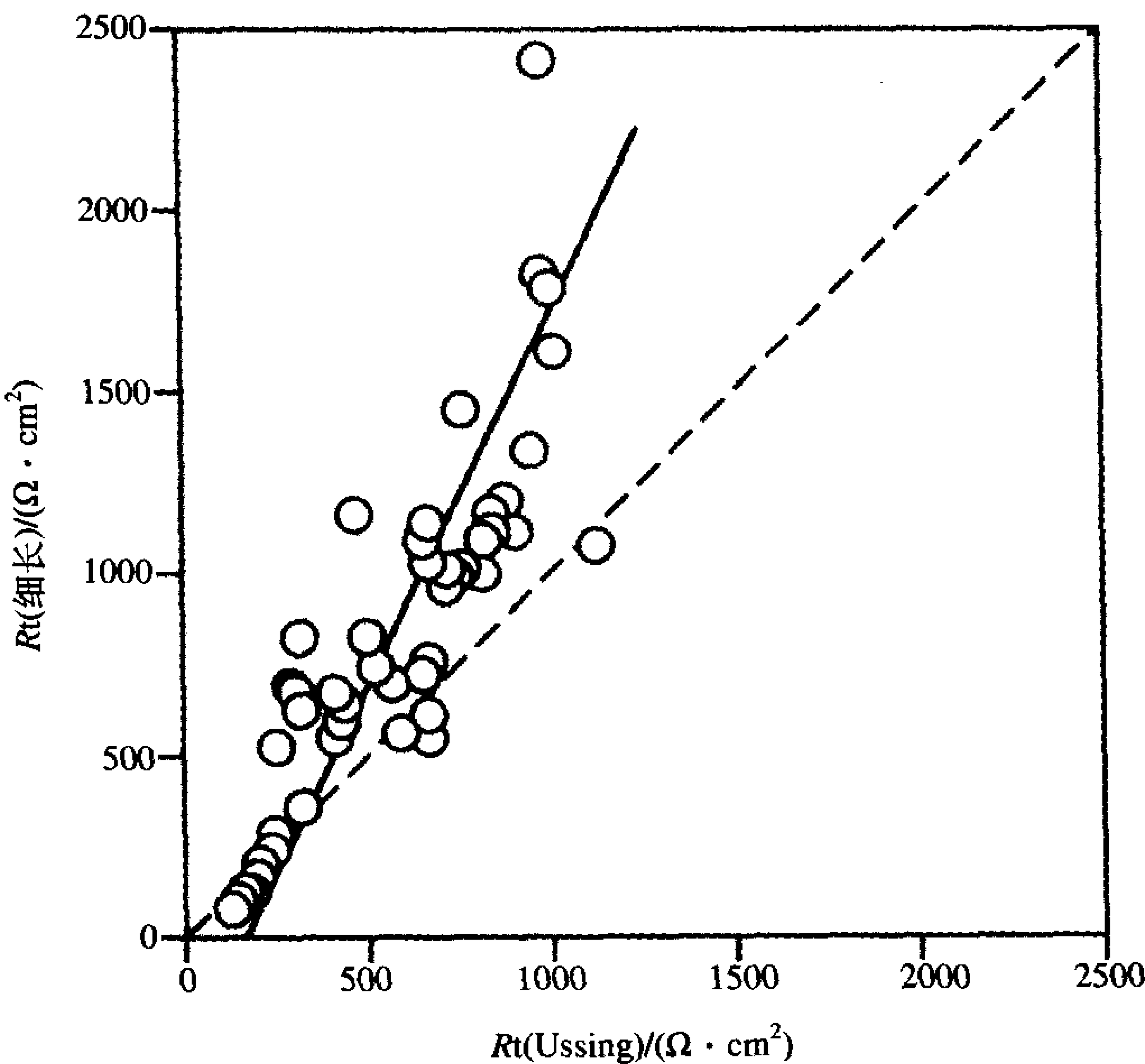


图 11.6　对人导气管上皮跨上皮电阻的测量比较

使用细长电极欧姆计，Rt(细长)；在 Ussing 孔中测量，Rt(Ussing)。对同一上皮进行两种测量。使用细长欧姆计的测量值总是比实际 Rt 高。虚线为恒等直线，实线为数据的拟合线

3.6.2　形态

(1) 应当使用 SEM 评价每套培养的顶部表面形态。当上皮成熟和分化时，顶部表面形态会发生改变。图 11.7 是人支气管上皮细胞接种后增殖期的 SEM 显微照片[14]。

133

(2) 接种后 3d，细胞表现出铺满(图 11.7 A，B)。细胞大小有差异，大部分细胞显示有短的微绒毛。但纤毛细胞很少。接种 6d 后，大部分细胞显示出不成熟的纤毛(图 11.7 C，D)。在接种后第 10 天(图 11.7 E，F)和第 14 天(图 11.7 G，H)，单层表面完全被纤毛所覆盖，难以确定单个细胞。在某些区域，有无定形物质与纤毛相混合。

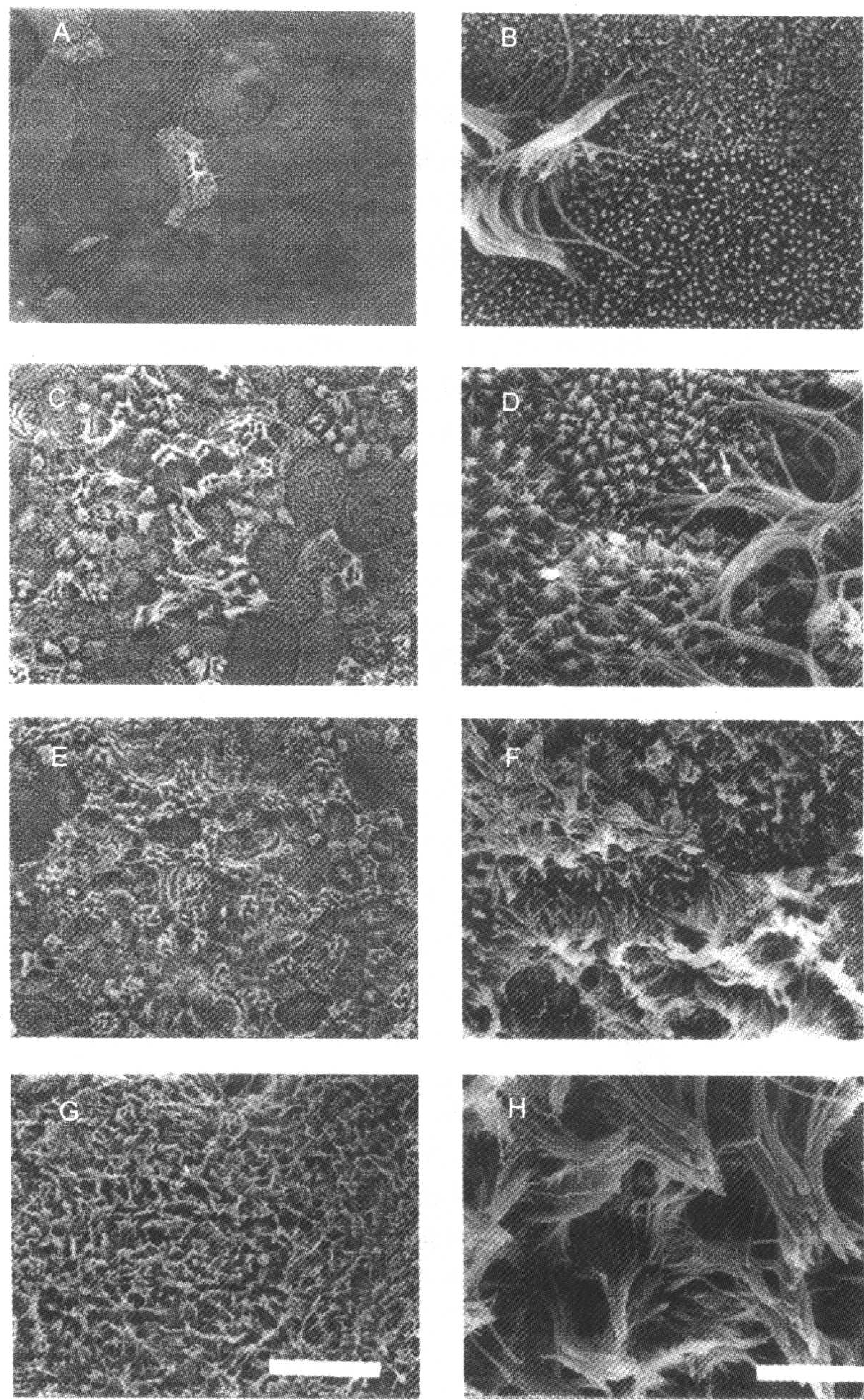


图 11.7　生长于空气-液体界面的人导气管上皮原代培养的扫描电镜照片

接种后不同时间细胞单层的显微照片如下：3d(A、B)，6d(C、D)，10d(E、F)，以及 14d(G、H)。在照片 A、C、E、G 中，比例尺为 37.5μm，在照片 B、D、F、H 中，比例尺为 5μm。在第 3 天时，可以看到具短微绒毛的未分化细胞包围着零星的纤毛细胞。到第 6 天，大部分细胞都有纤毛(图 D 中窄箭头)或不成熟纤毛(宽箭头)。到第 10 天和第 14 天，大部分细胞都有纤毛。授权引用自参考文献[14]

(3) 根据我们的经验，到培养第 14 天时，上皮已完全分化，可以用于实验了。在导气管样品中，培养后发育为纤毛细胞的上皮细胞的百分比变化很大。这可以部分地反映人供者的既往史。例如，长期经受烟草烟气或其他伤害，或者受疾病的侵害，会在体内

损伤导气管上皮，也会影响体外的结果。缩短分离时间以提高纤毛细胞群的程度，可以提高前 12h 内黏附于膜上纤毛细胞的比例。

4 注意事项

(1) 导气管上皮培养的成功发展依赖于原始组织的活力。收集的细胞需要保持足够的活力和数目，以保证活力细胞能够均匀地接种于通透性膜支持物上。然后依赖完整的紧密连接产生铺满的上皮。依照这些要求，获得足够的有活力的人导气管样品，以收集足够数量的细胞可能有困难。本研究获得了几种不同来源的人导气管鼻组织和肺。它们包括内窥镜息肉切除术或内窥镜瘘管手术得到的鼻息肉和鼻甲骨。鼻息肉需要使用剪刀或锐性手工分离来得到完整的样品，而不能用机械的显微清除器切碎组织，尽管这是越来越流行的息肉切除术，因为我们从切碎的样品中收集的上皮细胞活力低下。

我们也曾尝试从获得的尸体检查中利用其气管和肺样品。由于死亡和收集组织之间的时间间隔以及较高的细菌、酵母菌污染风险，此来源也成问题。应避免在尸体检查手术中用水冲洗导气管上皮。笔者曾偶然成功地从气管得到了细胞，但下游导气管细胞的活力比较低下。

最成功的是，我们应用来源于人供者肺的活的气管和支气管段，得到了高质量的培养。这些肺是按照移植的无菌标准进行准备和收集的，但后来被拒绝为人体移植。这些肺浸泡于无菌的盐水中，密封于无菌的瓶中，湿式冰浴冷却。肺样品通常在取下 16~18h 内送达实验室。这些肺来自于所有年龄段和所有医疗史的供者。由于供者年龄大于 60 岁、或有脓血症、或长期吸烟、或有淤血和出血导致的肺损伤，供体肺在人体移植时被拒绝。因为上皮活力可能不同，我们根据导气管区域和分叶来分段分离组织段。来源于 CF 肺的导气管上皮，由于慢性炎症和感染，区域之间的活力变化特别大。

商业化来源的冷冻原代或一次传代的人导气管细胞为 Clonetics(Walkersville，MD)。当细胞连续传代以扩大数量时，此来源是经济的。但是，以使用原代和传代导气管细胞的相关实验为基础，笔者的实验室更喜欢原代细胞的形态和功能特性，因为它们更近似于体内导气管上皮细胞。

(2) 分支支气管的每一个分支都重复分支，其直径进行性地越来越小。我们的经验是，越细小的导气管段，产生活力细胞的能力越弱，产量也越低。考虑到时间、成本和活力细胞产量之间的平衡，我们的分离常规地终止于第 3 气管分支以下。但是，特殊需要和方案可能要求收集细小气管的细胞。

(3) 根据要求，分离时间可以有所变化。分离时间越长，单细胞分离就越充分。按阶段性时段从分离管中取出一小部分放在玻片上进行显微镜下的检查，可用来估计分离的程度。依据经验决定最佳分离时间是非常重要的。小细胞团块(大约 4~10 个细胞/团)比单细胞具有更高的黏附效率，并可用于细胞分配时的细胞群接种。我们通常在分离开始后 60~72h 收集细胞。

(4) 对于特定的方案，可能希望弃掉或隔离细胞收集悬液中的大细胞团块。可使用灭菌的 100μm 尼龙细胞滤网(Falcon，cat. no. 2360)达到此目的。

(5) Vitrogen 凝胶底物。按照制造商的说明，按 8∶1∶1 的比例混合冷的 Vitrogen 100、

无菌的预冷的 10×DMEM、预冷的 0.1N NaOH。用 pH 试纸，使用 0.1HCl 和 0.1NaOH 调节溶液 pH 至 7.4。然后把胶原溶液等分地放在膜支持物(150~200μL/0.6cm^2)的上表面。然后把包被的膜表面加温至 37℃(不要在 CO_2 中)，至少 1h 使凝胶固化。3h 内在凝胶上接种细胞。接种细胞前用培养液洗涤胶原。胶原凝胶表面不要使用真空抽气机。使用手持式抽气吸管球以避免损伤胶原凝胶。此凝胶底物在培养过程中易碎。据我们的经验，其中存在一个恒定的消耗率。因此，在特定实验中，我们总是进行多于所需的培养。

(6) 开始的 4~6d，我们在较高 CO_2(8%~9%)的空气中常规培养膜上的导气管细胞，直到培养维持了一个空气界面。然后培养转入 5% CO_2 的空气中长期维持。并非所有的导气管样品都要求这样加强的 CO_2 条件。但对于细胞生长达到铺满并形成可接受的跨上皮电阻来说，培养开始的几天是关键的时间窗口。如果细胞接种后 6d 未形成铺满状态，此后铺满的成功率就比较低。我们开始时使用高 CO_2 空气的方法进行导气管培养，得到了比较高的成功率。

136

(王希朝 译　戴博杰　段恩奎 校)

参考文献

[1] Wheater, P. R., Burkitt, H. G., and Daniels, V. G. (1987) Respiratory system, p. 178-190. In *Functional Histology*. Churchill Livingston, London.

[2] Thurston, R. J., Hess, R. A., Kilburn, K. H., and McKenzie, W. N. (1976) Ultrastructure of lungs fixed in inflation using a new osmium-fluorocarbon technique. *J. Ultrastruct. Res.* **56**,39-47.

[3] Sims, D. E., Westfam, J. A., Kiorpes, A. L., and Horne, M. M. (1991) Preservation of tracheal mucus by nonaqueous fixative. *Biotech. Histochem.* **66**, 173-180.

[4] Zabner, J., Smith, J. J., Karp, P. H., Widdicombe, J. H., and Welsh, M. J. (1998) Loss of CFTR chloride channels alters salt absorption by cystic fibrosis airway epithelia *in vitro*. *Mol. Cell* **2**, 397-403.

[5] Walters, R. W., Grunst, T., Bergelson, J. M., Finberg, R. W., Welsh, M. J., and Zabner, J. (1999) Basolateral localization of fiber receptors limits adenovirus infection from the apical surface of airway epithelia. *J. Bioi. Chem.* **274**,10219-10226.

[6] Drapkin, P. T., O'Riordan, C. R., Yi, S. M., Chiorini, J. A., Cardella, J., Zabner, J., and Welsh, M. J. (2000) Targeting the urokinase plasminogen activator receptor enhances gene transfer to human airway epithelia. *J. Clin. Invest.* **105**, 589-596.

[7] Zabner, J., Seiler, M. P., Launspach, J. L., et al. (2000) The osmolyte xylitol reduces the salt concentration of airway surface liquid and may enhance bacterial killing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**,11614-11619.

[8] Ferkol, T., Eckman, E. A., Swaidani, S., Silski, C., and Davis, P. (2000) Transport of bifunctional proteins across respiratory epithelial cells via the polymeric immunoglobulin receptor. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **161**,944-951.

[9] Smith, J. J., Travis, S. M., Greenberg, E. P., and Welsh, M. J. (1996) Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell* **85**, 229-236.

[10] Yamaya, M., Finkbeiner, W. E., Chun, S. Y., and Widdicombe, J. H. (1992) Differentiated structure and function of cultures from human tracheal epithelium. *Am. J. Physiol.* **262**, L713-L724.

[11] Wang, G., Slepushkin, V. A., Bodner, M., et al. (1999) Keratinocyte growth factor induced epithelial proliferation facilitates retroviral-mediated gene transfer to distal lung epithelia *in vivo*. *J. Gene Med.* **1**, 22-30.

[12] Cotton, C. U. and Reuss, L. (1996) Characterization of epithelial ion transport, p. 70-92. In *Epithelial transport: a guide to methods and experimental analysis* (Wils, N. K., Reuss, L. and Lewis, S. A., eds.). Chapman & Hall, London.

[13] Lewis, S. A. (1996) Epithelial electrophysiology, p. 93-117. In *Epithelial transport: a guide to methods and experimental analysis* (Wills, N. K., Reuss, L. and Lewis, S. A., eds.). Chapman & Hall, London.

137

[14] Zabner, J., Zeiher, B. G., Friedman, E., and Welsh, M. J. (1996) Adenovirus-mediated gene transfer to ciliated airway epithelia requires prolonged incubation time. *J. Virol.* **70**, 6994-7003.

第12章　小鼠角质细胞的原代培养

139

Kairbaan Hodivala-Dilke

1　引言

在了解皮肤的生长、维持及其疾病的细胞及分子生物学机制方面，人新生儿角质细胞培养技术是一种有价值的研究手段[1,2]。随着小鼠转基因研究的兴起，对于发育和疾病的认识上升到了一个新的水平。近来，几种转基因小鼠模型的建立对了解某些皮肤疾病发病的分子机制带来了新的契机，例如，与类天疱疮(bullous pemphigoid)和牛皮癣有关的基底部上层整联蛋白表达模型[3]，以及与水疱样病变相关的整联蛋白敲除模型[4,6]。

尽管建立小鼠模型非常重要，但从转基因小鼠所分离表皮角质细胞的细胞生物学研究也是必需的。本章将以 Dlugosz 等的方法[7]为基础，介绍从新生小鼠分离表皮角质细胞的方法。简言之，将获得的新生小鼠的皮肤，通过胰酶消化过夜，分离表皮单层。将获得的角质细胞单细胞悬液培养于胶原包被的组织培养皿中，培养液为低钙培养基。本方法是最简单的快速获得大量小鼠角质细胞的方法。本方法获得的表皮角质细胞几乎适用于所有的从免疫组织化学到细胞转染的细胞生物学和分子生物学研究。

2　材料

(1) 培养皿包被液：30μg/mL Vitrogen(Nudacon, cat. no. P99E131C)∶10μg/mL 纤粘连蛋白。它们的储液浓度分别为 3mg/mL 和 1mg/mL，临包被前，用 PBS 按 1∶100 比例稀释[见注意事项(2)和(3)]。

140

(2) 灭菌的分离器械。

(3) 组织培养皿。

(4) 灭菌的 PBS。

(5) 10%碘，溶于 PBS(Sigma)。

(6) 70%乙醇。

(7) 0.25%胰酶(Life Technologies)。

(8) 灭菌的巴氏滴管。预先配制下列试剂，并灭菌处理。分装后冷冻保存，或按照要求保存于 4°C。

(9) Chelex 螯合树脂处理的 FCS：FCS 中钙的浓度较高。在这种小鼠角质细胞原代培养方法中，采用 Chelex-100 树脂(BioRad, cat .no. 142-2832)去除 FCS 中的游离钙。这是一个重要的步骤。100g 树脂可以处理 500mL FBS。

a. 100g Chelex 树脂用 400~500mL 蒸馏水溶胀约 1h。

b. 边搅拌，边用浓盐酸调 pH 至 7.4[见注意事项(1)]。

c. 用 Whatman 1 号滤纸过滤树脂。

d. 将树脂刮入 500mL FCS，然后用磁力搅拌器搅拌 3h(室温)或过夜(4℃)。

e. 用 Whatman 1 号滤纸过滤 FCS，弃树脂。

f. 最后，用 0.2μm 滤膜过滤 FCS，以每份 20mL 分装，−20℃保存。

(10) 0.1mol/L $CaCl_2$ (Sigma)：用蒸馏水配制 15mL 0.1mol/L $CaCl_2$ (0.24g/ 15mL)。用 0.2μm 滤膜过滤后，4℃保存。

(11) 0.2mg/mL 氢化可的松(Sigma)：将 50mg 氢化可的松溶入 10mL 95%乙醇，制备高浓度储液，按每份 0.4mL 分装，−20℃保存。在 0.4mL 高浓度储液中加入 9.6 mL 灭菌的无血清 EMEM，配制成 0.2mg/mL 储液，按每份 1.0mL 分装，−20℃保存。

(12) 5mg/mL 胰岛素(Sigma)：将 100mg 胰岛素溶入 20mL 0.005mol/L HCl(10μL 浓盐酸溶于 20mL H_2O)，制备 5mg/mL 胰岛素储液。用 0.2μm 滤膜过滤灭菌，按每份 0.5mL 分装，−20℃保存。

(13) 10μg/mL 表皮生长因子(EGF)(Life Technologies)。

a. 将 100μg EGF 溶于 1mL 0.1%BSA (10mg 超纯 BSA 溶于 10mL 水)。

b. 用 0.1%BSA 定容至 10mL。

c. 用 0.2μm 滤膜过滤灭菌，按每份 0.5mL 分装，−20℃保存。

(14) 10^{-7}mol/L 霍乱毒素(Sigma)。

a. 将 1mg (1 支)霍乱毒素溶于 1.18mL 蒸馏水，配制 10^{-5} 高浓度储液，4℃保存(避免冻融)。

b. 将 0.1mL 高浓度储液溶于 10mL 含有 4%螯合处理 FBS 的 EMEM 中，配制成 10^{-7}mol/L 霍乱毒素。用 0.2μm 滤膜过滤灭菌，按每份 0.5mL 分装，−20℃保存。

141

(15) 培养液：无 Ca^{2+} EMEM，每 500mL 添加如下成分。

a. 8%螯合处理的 FCS；20mL 螯合处理的储液。

b. 0.05mmol/L $CaCl_2$；250μL 0.1mol/L 储液。

c. 0.4μg/mL 氢化可的松；1.0 mL 0.2mg/mL 储液。

d. 5μg/mL 胰岛素；0.5mL 5mg/mL 储液。

e. 10ng/mL EGF； 0.5mL 10μg/mL 储液。

f. 10^{-10}mol/L 霍乱毒素；0.5mL 10^{-7} 储液。

g. 100U/mL 青霉素，100μg /mL 链霉素；5.0mL 100 倍青链霉素储液。

h. 2mmol/L *L*-谷氨酰胺；5.0mL 200mmol/L 储液。

4°C 保存灭菌处理的 500mL 试剂瓶。

(16) 70μm 细胞筛(Becton Dickinson)。

3 方法

3.1 准备胶原包被的培养皿

(1) 准备新鲜的培养皿包被液，5mL 涂布 25cm² 培养皿。

(2) 33℃孵育数小时或 4℃过夜。

(3) 吸出胶原，加入细胞[见注意事项(4)]。

3.2 准备角质细胞培养

(1) 处死新生小鼠[见注意事项(5)]，用封口膜裹住，置冰上，直到开始操作[见注意事项(6)]。其余步骤应当在层流通风橱内进行，保持无菌状态。

(2) 将小鼠的尸体完全浸没在盛有 10%碘 PBS 的 100mL 烧杯内，消毒 10min，然后丢弃碘溶液。

(3) 用 PBS 洗涤尸体 2 次。

(4) 在冰上，将尸体浸入 70%乙醇，浸泡 10min，然后弃乙醇。

(5) 用灭菌 PBS 洗涤尸体 2 次，然后将尸体浸泡于 4℃灭菌的 PBS 当中。

(6) 用灭菌的解剖刀截去四肢和尾巴[见注意事项(7)]。

(7) 将尸体置于灭菌的组织培养皿中，用灭菌的剪刀从尾到口吻纵向剪开皮肤，用两对灭菌的镊子剥离创口到头部的皮肤[见注意事项(8)]。

(8) 将皮肤置于干净的培养皿，真皮层向下，用弯头镊展开皮肤的边缘。干燥 5~10min[见注意事项(9)]。

(9) 用弯头镊夹住皮肤的边角，真皮层向下，小心将皮肤放在 5mL 灭菌的 0.25%胰酶溶液上，胰酶盛在 60mm 组织培养皿中。

(10) 用镊子的尖端小心地平展开皮肤边缘的折叠，使大部分的表皮层漂浮在胰酶溶液表面。

142

(11) 如果小鼠的基因型不同，应当在培养皿上注明，以便与尾部样品相对应。

(12) 4℃孵育 15~24h[见注意事项(10)]。

(13) 将皮肤转移到干的灭菌的组织培养皿中，表皮层向下铺展。用灭菌的巴氏管去除真皮层[见注意事项(11)]。

(14) 在组织培养皿内，用两把手术刀交叉切碎表皮层。

(15) 用 10mL 滴管将皮肤悬浮于 6mL 培养液中，然后转入 15mL 的 Falcon 管内，振摇，使之形成单细胞悬液[见注意事项(12)]。

(16) 用 70μm 尼龙细胞筛过滤细胞悬液，用新的 50mL Falcon 管收集细胞，以去除死细胞片层。

(17) 为获得最大的细胞得率，用 5mL 新鲜培养液清洗原 Falcon 管，再次过筛，细胞悬液滴入同一个 Falcon 管内(细胞的终体积应当为 10~11mL)。

(18) 将每一个皮肤样品的 10mL 细胞悬液加入胶原包被的 10cm 组织培养皿内。

(19) 小鼠角质细胞应当培养在 33~34℃、8% CO_2，5~7d 后可以进行实验。

(20) 当细胞满度达到 90%时，按照 1∶3 的比例传代，可以传代 1~2 次。

(21) 角质细胞在 5~7d 内长满，呈卵圆形。

(22) 一旦长满，细胞开始分化，个别细胞增大，呈扁平状。如果 20%以上的细胞出现分化状态，不宜再传代。因此，最好是在细胞长满之前传代或使用。

(23) 每 2 天更换新的培养液 1 次。

(24) 每只新生小鼠的表皮能够分离 5×10^6~10×10^6 个细胞。

4 注意事项

(1) 溶胀 Chelex 树脂的 pH 调节过程要持续数小时。每次应当加入 200μL HCl，持续不断搅拌，直到 pH 达到 7.4。

(2) Vitrogen 始终保存在 4℃。既防止储液冻融，也要避免其在配制包被液时升温。

(3) 纤粘连蛋白并不是包被液必需的成分。大多数角质细胞能够在无纤粘连蛋白的情况下良好生长，但是加入纤粘连蛋白能够促进某些有贴壁缺陷的细胞生长。

(4) Vitrogen 溶液有强酸性，因此在孵育之后应当吸干净包被液，残留的酸性可能会杀死细胞。

(5) 为获得角质细胞而处死新生小鼠时，关键一点是尽量避免损伤皮肤。因此最适合的处死方法应当是吸入 CO_2 或用锐利的剪刀断头致死。

143

(6) 在分离细胞之前，尸体可以在冰上保存 6h。但是长时间的保存会降低细胞的得率和存活力。

(7) 如果有必要，可以用尾巴作基因型分析。在切除四肢和尾巴时，应当尽可能地靠近躯干切除。最简单的操作方式是，用圆头镊靠近躯干钳住四肢，然后用手术刀片贴着圆头镊切下四肢，从而防止破坏创口附近的皮肤。

(8) 避免损伤肠道，防止污染。

(9) 如果同时处理多个样品，应当在冷的培养皿内晾干皮肤。这是比较重要的一个步骤。这样不仅能够在时间上保证同时处理多个样品，还能增加皮肤的硬度，有助于以后的处理步骤。但是要防止皮肤完全干燥。

(10) 在向胰酶溶液转移时，应当允许皮肤自由地漂浮，表皮层一定要在胰酶溶液的上面。一定要铺展开皮肤的边缘，否则容易影响消化过程。

(11) 如果消化效果良好，表皮层应当是平整而且干燥，呈薄纱状，而真皮层则表现为模糊的云翳状，易于剥离。如果真皮层不易剥离，说明消化效果不佳，应当丢弃皮肤。

在这一步骤，应当防止气泡形成，否则会损伤细胞。

(铁国栋 译　周家喜 校)

参 考 文 献

[1] Rheinwald,J.G.(1980) Serial cultivation of normal human keratinocytes. *Methods Cell Biol.* **21A**,229-254.

[2] Rheinwald,J.G. and Green,H.(1975) Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells, *Cell* **6**, 331-343.

[3] Carroll,J.M., Romero, M.R., and Watt,F.M.(1995) Suprabasal integrin expression in the epidermis of transgenic mice results in a phenotype resembling psoriasis. *Cell* **83**, 957-968.

[4] Van der Neut,R., Krimpenfort,P., Calafat,J., Nissen, C.M., and Sonnenberg,A.(1996) Epithelial detachment due to absence of hemidesmosomes in integrin b4 null mice. Nat. *Genet.* **13**, 366-369.

[5] Georges-Labouesse,E., Messaddeq N., Yehia G., Cadalbert.,L.,Dierich,A., and Le Meur,M. (1996) Absence of integrin α6 leads to epidermaolysis bullosa and neonatal death in mice. *Nat.Genet.* **13**, 370-373.

[6] Guo,L., Degenstein,L., Dowling,J., Yu,Q.C. Wollman, R. Perman,B., and Fuch,E. (1995) Gene targeting of BPAG1: abnormalities in mechanical strength and cell migration in stratified epithelia and neurologic degeneration, *Cell* **81**,233-243.

[7] Dlugosz,A.A., Glick,A.B., Tennenbaum,T., Weinberg,W.C., and Yuspa,S.H. (1995) Isolation and utilization of epidermal keratinocytes for oncogeneresearch. *Methods Enzymol.* **254**,3-20.

[8] Dipersio,M., Hodivala-Dilke,K., Jaenish,R., Kreidberg,J., and Hynes,R.O.(1997) α3b1 integrin is required for normal development of the epidermal basement membrane.J.*Cell Biol.* **137**, 729-742.

[9] Hodivala_Dilke,K.M., DiPersio,C.M., Kredberg,J.A., and Hynes,R.O. (1998) Novel roles for alpha3beta1 integrin as a regulator of cytoskeletal assembly and as a trans-dominant inhibitor of integrin receptor function in mouse keratinocytes. *J. Cell Biol.* **142,** 1357-1369.

145

第13章 培养的上皮细胞的凋亡分析

Andrew P. Gilmore　Charles H. Streuli

1 引言

本章主要介绍几种用于定量分析乳腺上皮细胞凋亡的检测方法。下述每种方法都针对不同的凋亡阶段。市售的许多检测试剂盒主要采用 caspase 的荧光底物等试剂，能够检测整个细胞群体的凋亡水平，而本章主要介绍的是我们发展的一些能够检测单个凋亡细胞的方法。

在细胞分化和正常的细胞替代过程中，不断地有细胞死亡。大多数情况下，细胞通过其固有的机制发生凋亡，从而排除损毁的细胞[1,2]。凋亡不同于被动的细胞死亡和坏死，后两者会导致细胞裂解，有诱发炎症以及组织损毁的危险。实质上，凋亡的目的就是在不诱发破坏性炎症反应的前提下排除损毁的细胞[3]。抑制正常的凋亡机制可能会造成一系列严重的后果。凋亡失控可能导致退行性改变。与之相反，凋亡机制障碍可能导致肿瘤发生[4]。正常状态下，细胞需要持续的存活信号，从而防止凋亡机制的激活。存活信号可能由生长因子、细胞与细胞外基质的黏附以及细胞与细胞之间的黏附组成。

为了杀死细胞同时又不引起任何炎症反应，必须经过一系列有序的步骤细胞才能发生凋亡，而且每一步均有其特征性的指征[5,6]。相关的步骤包括：① 识别期；② 凋亡机制激活，允许细胞死亡；③ 完成期，此时细胞内胱冬蛋白酶(caspase)大量降解特异性底物；④ 巨噬细胞清除期。各期之间的界限并不十分清晰，或许它们本身就是界限，可用于识别凋亡过程。一般 caspase 以无活性的酶原形式存在于正常细胞中，它的激活过程是凋亡的关键环节。在细胞趋向死亡的过程中，caspase 发生降解，切除酶原结构域，然后双聚化，形成有活性的酶。caspase 通过两种途径激活，其一是释放线粒体当中的细胞色素 c，并以其作为一种辅助因子，进而形成一种称为凋亡小体的多蛋白复合体[7,8]，富集并激活 caspase 家族成员。其二是通过激活细胞表面的 Fas 和 TNF-R 等死亡受体，进而富集并激活 caspase。在这两种激活途径的下游，其他的 caspase 家族成员均能通过水解级联反应被激活，从而大范围降解细胞蛋白。caspase 激活过程为分析细胞凋亡提供了关键的指征，其中之一已经能够通过多种方法检测。caspase 激活后，凋亡迅速发生，表现为细胞核固缩，caspase 激活核酶，进而降解 DNA，形成核小体碎片。质膜形成泡状结构，细胞裂解成包含碎片，防止炎症物质释放。包被细胞碎片的质膜也发生改变，其外侧出现磷脂酰丝氨酸[9]。后者作为一种巨噬细胞表面受体的配体，促进清除这种有害残体。

146

对于致力于细胞凋亡检测的研究人员，精确控制的凋亡特性提供了许多理想的指征，以便于确定凋亡是否真正发生，进而对其进行定量研究。但是，此类研究必须谨慎，需要同时检测多个可能的指征，以确信细胞是否真的以凋亡的方式发生死亡。有的指征可能出现在凋亡后期。一旦细胞开始凋亡，整个过程非常迅速，可能在几分钟之内发生[10]。

但是，在许多情况下，细胞趋向凋亡的时间可能较长，例如，在 DNA 损伤药物处理的 48~72h 后，细胞才开始死亡。某些情况下，正在凋亡的细胞外观十分正常。同样，上皮细胞系也可能影响凋亡的发生,因为选择上皮细胞系就是因为它们具备较强的存活能力。在我们的研究中，乳腺癌细胞系(MCF-7、MDA-MB-31)能够完全抵抗某些损伤，而此类损伤能够在 24h 内诱发 90%原代细胞凋亡。事实上，癌细胞系的抵抗能力要强于原代肿瘤细胞。

凋亡的速度很快，因此需要注意其他的一些因素。在体内，巨噬细胞能够快速清除凋亡的细胞以及它们留下的痕迹。在培养体系中没有巨噬细胞来清除细胞碎片，使得细胞碎片大量积累，而且很少有证据能够表明哪一个细胞发生了凋亡，这给凋亡的定量研究造成许多不便。由于鉴别细胞凋亡的窗口期极短，而且也很难判断哪些细胞已经完成凋亡，或哪些细胞正在开始凋亡。因此，计数一个细胞群体中凋亡细胞的数量可能只是概括的反映，而且可能大于实际情况。解决这个问题的一个简单方法就是计数所有必要的细胞群体的数量，最终再次重复这个过程。

2 材料

2.1 通过检测 caspase 3 的激活和细胞核形分析确定贴壁细胞的凋亡

(1) 13mm 盖玻片(Merck)。

(2) 12 孔组织培养板(TCS)。

(3) 磷酸盐缓冲液(PBS)(Life Technologies)。

(4) 新配制的溶于 PBS 的 3.7%多聚甲醛[见注意事项(1)]。

(5) 0.5% Triton X-100，溶于 PBS。

(6) 马封闭缓冲液：150mmol/L NaCl, 25mmol/L Tris-Cl, pH7.6, 0.1% Triton X-100, 0.05% Tween-20, 0.1% 马血清, 0.05% 叠氮钠。

(7) 抗 caspase3 抗体[见注意事项(2)]，荧光标记二抗(Jackson Immunoresearch Lab)。

(8) 4μg/mL Hoeschst 33258(Sigma)。

(9) 荧光增强剂[见注意事项(3)]。

(10) 载玻片(Merck)。

2.2 通过免疫组织化学计数脱落的凋亡细胞

(1) Cytospin 离心机(Shandon)。

(2) Polysine 载玻片(Merck)。

(3) 蜡笔(DAKO)。

2.3 通过检测 annexin V 分析细胞膜的极性

(1) annexin V 结合缓冲液：10mmol/L HEPES/NaOH, pH7.4, 140mmol/L NaCl, 2.5mmol/L $CaCl_2$。

(2) 生物素标记的 annexin V (BD Pharmingen)。

(3) FITC 标记的链抗生物素蛋白(BD Pharmingen)。

(4) 新配制的 3.7%多聚甲醛(溶于 PBS)。

(5) PBS。

148 2.4 分离贴壁细胞的细胞质和线粒体

(1) PBS。

(2) 高渗缓冲液：10mmol/L NaCl, 1.5mmol/L $MgCl_2$，10mmol/L Tris-HCl, pH7.6, 1mmol/L NaF，100μmol/L 硅酸钠，1×蛋白酶抑制混合剂(Calbiochem)。

(3) 具有玻璃活塞的 Dounce 匀浆器(Wheaton)。

(4) 5×等渗缓冲液：525mmol/L 甘露醇，172mmol/L 蔗糖，12.5mmol/L Tris-HCl，pH7.6，2mmol/L EDTA。

(5) Beckman TL100超速离心机，以及适用于0.5mL样品的转头(TLA100 或TLA100.1)。

2.5 通过免疫组织化学检测 Bax 活性——向线粒体的转位

(1) 13mm 盖玻片(Merck)。

(2) 12 孔组织培养板(TCS)。

(3) Mitotracker green-fm (Molecular Probe)。

(4) 细胞固定与染色剂(见 2.1)。

(5) 抗 Bax 抗体[见注意事项(4)]。

(6) Cy3 或 TRITC 标记的二抗(Jackson Immunoresearch Lab)。

3 方法

3.1 通过检测 caspase 3 的激活和细胞核形分析确定贴壁细胞的凋亡

caspase 激活是细胞凋亡的中心事件。已经存在数种检测细胞群体中 caspase 活化的生物化学方法，但是它们并不适用于检测群体中的单个细胞。caspase 3 广泛存在于大多数细胞，能够被绝大多数凋亡损伤激活。近来，已经获得能够特异识别激活的 caspase 3 的抗体。细胞核退化是细胞凋亡的另外一个标志，而且已经有许多方法能够检测凋亡细胞的细胞核，其中许多方法相当复杂，而且更适用于人为诱导的情况。简便而直接的方法是用 Hoescht 或 DAPI 等 DNA 染料标记，然后检测细胞核形态。这些方法足以精确地量化分析贴壁上皮细胞的凋亡，特别适用于涉及瞬时转染的实验。

(1) 细胞应当培养在 12 孔板内的盖玻片上[见注意事项(5)]。我们采用 13mm 盖玻片，因为它能放入 12 孔板，而且便于洗涤和同时处理多个样品。

(2) 一个实验之后，在室温下用 1mL PBS 洗涤细胞。

149 (3) 用 3.7%多聚甲醛在室温固定 10min[见注意事项(1)]。

(4) 1mL PBS 洗涤 2 次。

(5) 用 0.5% Triton X-100，室温处理 5min。

(6) 用 PBS 洗涤。

(7) 将 20μL 抗活性 caspase 3 抗体(1：1000 稀释于马封闭缓冲液)滴在铺于玻片表面的封口膜上[见注意事项(2)]。

(8) 将盖玻片有细胞的一面放在稀释好的抗体上，放入湿盒，37℃孵育 1h。

(9) 将盖玻片放入 12 孔板，用 PBS 洗涤 3 次。

(10) 加入二抗，在 37℃，避光孵育 30min。

(11) PBS 洗涤 3 次。

(12) 用 Hoescht 33258(4μg/mL 溶于 PBS)室温染色 1min。

(13) PBS 洗涤 1 次。

(14) 将盖玻片放置于一滴荧光增强剂上面，同时加入适当的抗猝灭剂[见注意事项(3)]。

(15) 在放置盖玻片之前应当用蒸馏水洗涤数秒。

(16) 放到封片剂上之后，应当静置 2~3h，然后观察。

(17) 可以通过 caspase 染色或细胞核的形态分析凋亡。caspase 染色比较直接，而观察细胞核的形态则需要知道凋亡细胞核的形态特征。在组织培养体系中，这一点相当清晰，图例请参看图 13.1，重要特征为细胞核内部细节消失、固缩、着色深、表面光滑。在降解早期，细胞核外观呈单个的着色鲜明的结构，后期出现分裂。例图可以清晰地表明上述特征。

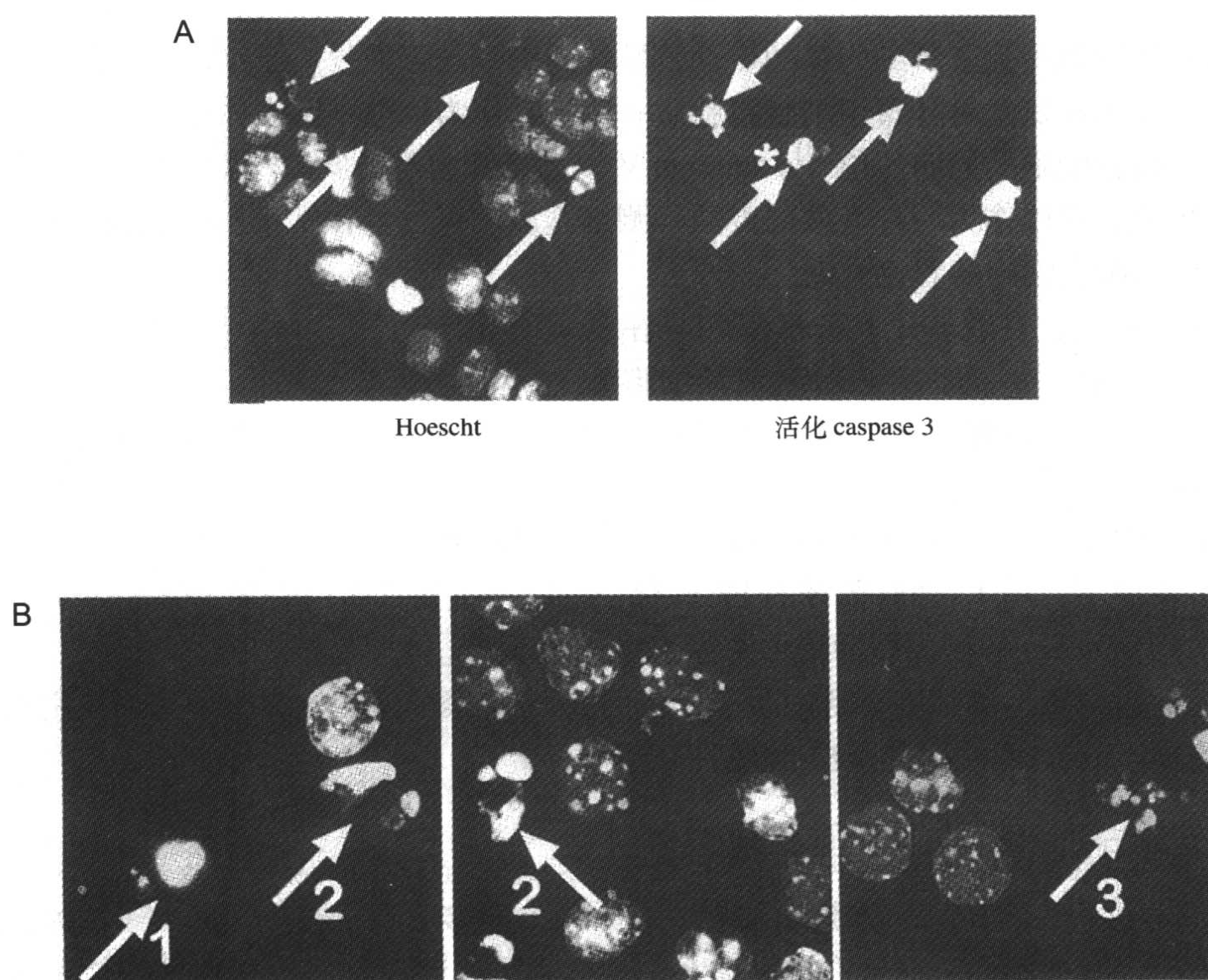


图 13.1 不与细胞外基质发生黏附的乳腺上皮细胞在培养数小时后开始凋亡

(A) 俘获细胞前，将细胞与非黏附底物共同培养 6h，然后固定，并按照前述方法用 Hoescht 和专一识别活化 caspase3 的多克隆抗体标记细胞。箭头所指为凋亡细胞。注意星号标记的细胞，或许因为细胞已经裂解，细胞核已经丢失，所以这些细胞尽管 caspase3 染色呈阳性，但是检测不到细胞核。在体内，上述细胞碎屑能够被巨噬细胞清除，但是在体外培养体系中，却被保存下来。(B)用与图 A 相似的方法处理乳腺上皮细胞，然后用 Hoescht 单染。箭头标示凋亡细胞核 3 种不同表现：① 细胞核发生固缩；② 细胞核开始裂解；③ 细胞核高度裂解

3.2 通过免疫组织化学计数脱落的凋亡细胞

观察贴壁细胞凋亡时遇到的一个重要问题是凋亡的细胞脱离并漂浮于培养液中。在实验结束时检测仪检测贴壁细胞，获得的数据显著低于实际死亡的细胞数量。因此收集游离的细胞，并用上述方法予以检测，是非常重要的环节。我们的实验室就是采用这种简单的操作方法，收集培养液当中的细胞，做进一步的检测。

(1) 收集细胞培养液，装入适当的离心管中，离心沉淀(我们采用 1.5mL Eppendorf 管和小型冷冻离心机)。

(2) 1300*g* 离心 5min，弃上清。为防止细胞丢失，应当在管中剩余 100μL 培养液。

(3) 用 1mL PBS 洗涤贴壁细胞，合并入离心管中，再次离心。

150 (4) 将细胞放到 Polysine 板上，因为其表面有电荷，能够促进细胞黏附。1300*g* 离心 10min，将其定容为 50μL[见注意事项(6)]。

151 (5) 在相差显微镜下观察细胞密度。如果有必要，可以再次定容[见注意事项(6)]。

(6) 固定细胞，并按照前述步骤染色。

3.3 通过检测 annexin V 分析细胞膜的极性

凋亡的细胞丧失了其细胞膜的极性，导致磷脂酰丝氨酸暴露于细胞膜外侧。正常状态下，磷脂酰丝氨酸只分布于细胞膜胞质一侧。它作为巨噬细胞表面受体的配体，是吞噬作用中凋亡细胞的靶向部位[11]。annexin V 以高亲和力与磷脂酰丝氨酸结合，因此在完整的细胞中，可以作为一种有效的方法检测细胞膜的极性。正常细胞不能被 annexin V 染色，但是凋亡细胞的着色升高。

(1) 实验前，在载玻片上培养细胞[见注意事项(5)]。

(2) 实验后，室温下用 PBS 洗涤活细胞 2 次。

(3) 加入 1∶20 稀释的生物素标记的 annexin V(溶于 annexin V 稀释缓冲液)，室温放置 15min。

(4) 室温下，用 annexin V 稀释缓冲液洗涤 1 次，约 5min。

(5) 室温下，用 1∶200 稀释的 FITC 标记的链抗生物素蛋白孵育 15min。

(6) 用 annexin V 稀释缓冲液再洗涤 1 次，约 5min。

(7) 此时，可检测细胞存活的状态，或用 3.7%多聚甲醛固定细胞，允许使用相应的抗体标记转染或显微注射的蛋白质[见注意事项(7)]。

3.4 分离贴壁细胞的细胞质和线粒体

在凋亡过程中，Bcl-2 家族的前凋亡成员 Bax 能够从胞质转位，进入线粒体，进而引起细胞色素 c 的释放。已经在多种体系中观察到了这种现象[5,12,13]。在非凋亡上皮细胞中，Bax 主要分布于细胞质，细胞色素 c 则主要分布于线粒体，但是在凋亡的上皮细胞中，它们的分布状态刚好相反。

(1) 在冰浴中，用 PBS 洗涤细胞 1 次，然后加入预冷的高渗裂解缓冲液(每个 35mm 培养皿加入 0.5mL)。

(2) 用橡皮刮将细胞刮入高渗缓冲液，置冰上，裂解 2min。

(3) 转入预冷的玻璃 Dounce 匀浆器，抽动 10~20 次[见注意事项(8)]。

(4) 可以取出一点裂解液，滴在盖玻片上，用相差显微镜观察[见注意事项(9)]。如果裂解充分，细胞核应当为外观光滑的独立结构。

(5) 加入冰冷的 100μL 5×等渗缓冲液。

(6) 转移入 1.5mL Eppendorf 管，4℃、1000*g* 离心 1min，沉淀细胞核以及未裂解的细胞，保存沉降物。 152

(7) 将上清在 4℃、100 000*g* 离心 30min(Beckman TL100 超速离心机，TLA100 或更小的转头)，分离细胞内膜，其中包括线粒体[见注意事项(10)]。

(8) 可采用 Western blot 检测步骤(4)的沉淀，以及步骤(6)的沉淀和上清中的标志性蛋白质，同时检测 Bcl-2 和细胞色素 c[见注意事项(11)]。

3.5 通过免疫组织化学检测 Bax 活性——向线粒体的转位

许多研究人员证实，随着 Bax 向线粒体转位，其构象同时发生改变，可以通过免疫组织化学检测其 N 端隐藏位点观察到这种变化[12,14]。现在已经有很多市售的抗体能够识别这个位点[见注意事项(4)]。这种方法能够用于检测单个细胞中 Bax 的转位和激活，而不是整个细胞群体。

(1) 实验前，在盖玻片上培养细胞[见注意事项(5)]。

(2) 实验的最后 30min,在培养液中加入 MitoTracker Greenm,终浓度为 500nmol/L[见注意事项(12)]。

(3) 用 PBS 洗涤后，加入 3.7%多聚甲醛，室温固定 10min[见注意事项(12)]。

(4) 用 1mL PBS 洗涤 2 次。

(5) 用 0.5%Triton X-100(PBS 溶解)处理 5min，然后用 PBS 洗涤 2 次。

(6) 用马封闭缓冲液稀释一抗至 10μg/mL，取 20μL 滴在封口膜上，然后把盖玻片细胞一侧覆盖在抗体上，在湿盒内，37℃孵育 1h[见注意事项(4)]。

(7) 用 PBS 洗涤 2~3 次，每次用 1mL，洗涤 5min。

(8) 用 Cy3 或 TRITC 标记的二抗染色， 37℃避光孵育 30min。

(9) 用 PBS 洗涤 3 次。

(10) 用蒸馏水稍漂洗盖玻片，然后加入一滴含有防猝灭剂的封片剂封片[见注意事项(3)]。

4 注意事项

(1) 应当使用新配制的多聚甲醛。配制时，将多聚甲醛溶于 55~60℃ PBS(pH7.6),溶解约需要 1~2h。

(2) 尽管已经有多种合适的抗体，但是必须严格选择抗活性酶的抗体，而不是抗酶原形式的抗体。我们选用的是一种 RD 公司生产的兔多抗(cat. no. AF835)。尽管 Cell Signaling Technology 等公司也提供相似的产品，检测时，我们选用 Lackson 公司生产的 Cy3 标记的驴抗兔抗体。但是如果没有活化的 caspase 时，就必须要谨慎。caspase 存在多种同源形式，而且在某些情况下 caspase 3 并不存在或不能激活(如 MCF-7 细胞)。目前 153

有许多相似的试剂能够适用于 caspase7 和 caspase 9 等 caspase 家族的其他成员，但是我们没有尝试使用过。

(3) 检测后面将要提及的试剂时(如 mitotracker green-fm)，采用防猝灭剂是十分重要的因素，因为我们发现它们会迅速猝灭。我们使用的荧光封片剂购自 DAKO 公司(cat. no. S3023)。

(4) 在凋亡过程中，随着向线粒体的转位，Bax 同时发生构象改变。现在已经有许多抗体能够识别 Bax 氨基端的位点，因此能够识别具有活化、开放构象的 Bax。在凋亡过程中，Bax 的活化是凋亡细胞理想指征。我们采用 BD Pharmingen 生产的兔抗 Bax 多抗 (clone G206-1276)和 Zymed 生产的小鼠多抗(clone 5B7)，取得了理想的结果。

(5) 某些细胞系不能很好的黏附到盖玻片表面，当遇到损伤刺激时会全部脱落。如果条件许可，可以用酸洗涤盖玻片或使用胶原和明胶等适当的试剂包被盖玻片。在酸洗时，在大的烧杯中以 2∶1 比例混合硝酸和浓盐酸，配制几百毫升洗液。将盖玻片分散放入洗液，浸泡 2~3h，偶尔翻动即可。小心将酸液倒入其他容器，用流动水冲洗盖玻片，直到 pH 恢复正常。用蒸馏水冲洗盖玻片，然后转移到 70%乙醇内。可以选用多种方式包被盖玻片。我们一般使用 100μg/mL 胶原 I，4℃包被过夜。也可以选用明胶，纤粘连蛋白和多聚赖氨酸，均可促进细胞贴壁。底物可能会影响实验结果，因此需要谨慎选择。对于正常的乳腺上皮细胞，抑制凋亡需要整联蛋白介导的细胞黏附。一些非生理性底物，如明胶和多聚赖氨酸，则不能提供培养的上皮细胞所需的存活信号。

(6) 获得适当细胞浓度非常重要。如果浓度过大，染色后不易区分细胞。应当以每张盖玻片 200~300 个细胞为宜。如果浓度过大，应当适当调整细胞浓度。染色时，晾干盖玻片，用蜡笔(DAKO)圈住细胞样品，这样可以减少所用抗体的体积(20~30μL)。

(7) 使用 mitotracker 时，固定和打孔可能会减弱 annexin V 着色。

(8) 可以选用多种匀浆器。为了充分裂解细胞，应选用玻璃活塞的 Dounce 匀浆器。与同种的 Teflon 产品相比，Dounce 匀浆器的活塞与臼体的契合程度更高，可以从 Wheaton 公司购得。我们所选用匀浆器的容量是 5mL，裂解物为 0.5mL。也可以选用装有 19 号针头的注射器抽打细胞，以便充分裂解细胞。采用干冰/乙醇浴或液氮反复冻溶也可以达到相同的目的。尝试多种方法不仅有助于找到适合于所选细胞的裂解方法，也有助于掌握细胞的裂解程度。

154

(9) 无论选用哪种匀浆方法，重要的是确认它是否有效。在匀浆过程中，用相差显微镜观察，可以快速判断细胞是否被充分裂解。标准的细胞核清晰而光滑，同时无细胞质团块。当细胞过度裂解时，细胞核被破坏，释放出 DNA，从而形成细胞质团块。考察裂解方法有效与否，最好是采用 Western blot 检测每种裂解成分的标志分子[见注意事项(11)]。

(10) 采用本方法获得的沉淀块中包括所有的细胞内质膜，不能区分线粒体和内质网(ER)，不过稍做改进即可区分线粒体(14 000*g* 离心沉淀)和较轻的 ER 等成分。但是本方法不能用于检测细胞色素 c 的释放和 Bcl-2 家族的转位。

(11) 有许多非常有用的指征能够用于鉴定 ER、线粒体、细胞核和细胞质。我们选用如下指征：细胞核的指征为多聚 ADP 核酸多聚酶(BD Transduction Laboratories, cat. no. 65196E)；ER 的指征为 calnexin (StressGen，cat. no. SPA860)；线粒体指征为细胞色素氧

化酶亚基 I(Molecular Probes, cat. no. A6403); 细胞质的指征为 caspase 3(Santa Cruz, cat. no. sc-1224)。caspase 3 同样可以作为细胞凋亡的指征，因为此时它可以从 30kDa 的前体分裂为 11kDa 和 18kDa 两部分。为了检测细胞色素 c 的释放，我们选用了 BD Transduction Laboratory 公司生产的抗体(cat. no. 65981A)。

(12) Molecular Probe 公司销售的许多荧光染料均能够被活的线粒体吸收。在研究中，我们同时选用这些荧光染料和传统的免疫组织化学染色，此时选择线粒体的染色方法显得尤为重要。大多数这种染料不能被多聚甲醛固定，因此经过染色前的打孔处理后，容易丢失。Mitotracker green-fm (cat. no. M7514)能够被固定，但是它的染色强度也会受到一定影响。弥补的方法是将其浓度提高到 500nm，这比通常所建议的浓度要高。

(铁国栋 译　周家喜 校)

参 考 文 献

[1] Jacobson,M.D, weil,M., and Raff. M.C. (1997) Programmed cell death in animal development. *Cell* **88**, 347-354.

[2] Raff,M. (1998) Cell suicide for beginners. *Nature*. **396**,119-122.

[3] Savill,J.(2000) Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* **407**, 784-788.

[4] Nichol son,D.W. (2000) From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature* **407**,810-816.

[5] Dross,A., Jockel,J., Wei,M.C., and Korsmeyer,S.J. (1998) Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J* **17**, 3878-3885.

[6] Hengartner,M.O.(2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**, 770-776.

[7] Desagher,S., and Martinou,J.C. (2000) Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.* **10**, 69-77.

[8] Cain,K., Bratton,S.B., Langlais,C., Walker,G., Brown,D.G., Sun,X.M., and Cohen,G.M.(2000) Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes. *J Biol Chem.* **275**,6067-6070.

[9] Green,D.R., and Beere,H.M.(2000) Gone but not forgotten. *Nature* **405**,28-29.

[10] Green,D.R.(2000) Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. *Cell* **102**,1-4.

[11] Fadok,V.A., Bratton,D.L., Rose,D.M., Pearson, A., Ezekewitz,R.A.B., and Henson,P.M. (2000) A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* **405**, 85-90.

[12] Wolter,K.G., Hsu,Y.T., Smith,C.L., Nechushtan,A., Xi,X.G., and Youle,R.J. (1997) Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J. Cell Biol* **139**, 1281-1292.

[13] Gilmore,A.P., Metcalfe, A.D., Romer,L.H., and Streuli,C.H. (2000) Integrin-mediated survival signals regulate the apoptotic function of Bax through its conformation and subcellular localization. *J. Cell Biol* **149**, 431-446.

[14] Desagher,S., Osen-Sand,A., Nichols,A., et al. (1999) Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J. Cell Biol.* **144**, 891-901.

155

157

第 14 章　上皮细胞的标志——角蛋白

David L. Hudson

1　引言

无论是起保护作用的皮肤或肠道，还是具有分泌作用的腺体，其上皮组织均具有抵制理化应激和维持正常组织更新的能力。这种应激耐受性主要归功于特定的细胞骨架。在人类所有的细胞中，肌动蛋白纤维、微管及中等纤维是构成细胞质骨架的 3 种主要纤维。肌动蛋白纤维的主要作用是改变细胞形状及流动性，微管蛋白主要负责细胞定位及胞质极性，而中等纤维的作用是使细胞具有结构弹性[1]。与其他两种细胞骨架不同，中等纤维具有组织特异性，其直径为 10nm。主要包括以下 5 种类型：角蛋白纤维(各种上皮细胞)、波形蛋白纤维(间叶起源细胞)、结蛋白纤维(肌肉细胞)、神经胶质蛋白纤维(星形细胞)和神经纤维(神经)。

上皮细胞表达出典型的角蛋白，而角蛋白不仅在上皮组织类型细胞中表达，在其他处于分化状态的细胞中也有表达。角蛋白家族最初由 Moll 等分类[2]，目前已鉴定出 20 种不同的多肽。根据它们在二维凝胶电泳中的流动性，这些多肽又可分为碱性(I 型角蛋白) [1~9]和酸性(II 型角蛋白) [10~20]两大类。角蛋白纤维是含有相同数目的角蛋白 I 型和 II 型的异聚体，然后互相缠绕组合为成熟的纤维。所以上皮细胞表达角蛋白的最小数量为 2 条，即 I 型和 II 型角蛋白各含一条。尽管在体外 I 型角蛋白可以与任何一种 II 型角蛋白形成异二聚体复合物[3]，但在体内，不同的上皮组织仅表达特定的二聚体。所有多层上皮细胞组织的基底层细胞都表达 K5 及 K14[4,5]。但是，当细胞处于分化过程中或细胞迁移到基底层上层(suprabasal layer)表达新的组织特异性异二聚体时，K5 及 K14 的表达会下调(表 14.1)。这些新表达的角蛋白包括角化上皮中的 K1 和 K10 (如表皮)、非角化鳞状上皮中的 K4 及 K13 及角膜中的 K3 与 K12。在乳腺及前列腺等腺体组织中，基底层细胞也表达 K5/14，然而，腔上皮分泌细胞表达 K8/18[2]。

158

上皮组织的初级细胞与其衍生的增生细胞群表达角蛋白的方式是相似的，在合适的生长环境下，初级上皮细胞也表达特定分化的角蛋白[6~8]。上皮细胞表达较多的角蛋白且较稳定，用免疫组织化学的方法就可以较容易地检测到。这说明角蛋白是鉴定上皮细胞的理想标记分子且可用来检测上皮细胞的分化。

尽管角蛋白家族具有高度同源性，但每个成员的特异性抗体之间差异较大，现有多种抗体可以买到(表 14.1)。有一些抗体(如 LP34)可以识别多种角蛋白，并且可以与所有起源于上皮的细胞反应。这些抗体称为广谱角蛋白抗体。

为了鉴定角蛋白的表达，本章主要描述培养细胞的制备及染色方法。其检测方法有两种：第一种是免疫细胞化学方法，主要根据颜色反应检测抗体的结合；第二种是免疫荧光方法，主要是利用标记荧光素的二抗检测一抗，然后在落射荧光显微镜(epifluorescence microscope)或激光共聚焦显微镜下观察。两种方法的基本原理是相似的，

第二种方法较为简单，但它要求具备特定的荧光显微镜设备，而这种仪器并不是所有的研究者都拥有。如果是这样，免疫细胞化学方法将是唯一的选择。使用荧光素的另一个优点是不同物种或不同 Ig 类型的一抗可以与两种或更多的抗原同时结合，并且用不同标记的二抗检测。异硫氰酸荧光素(FITC,发绿色光)和四甲基罗丹明异硫氰酸(TRITC，发红色光) 是最常用的荧光素；另外，胺甲基香豆素(AMCA，发蓝色光)及印度碳青色素

159

表 14.1　上皮组织中的角蛋白表达

角蛋白	表达的特定组织	抗体	供应者[a]
5	所有复层上皮的基底层细胞	无供应	
14		LL002[5]	Novocastra Serotec
15	复层上皮斑状着色基底层细胞	LHK15[9]	Novocastra
1	复层上皮上基层细胞	34β b4[10]	Novocastra
2		无供应	
10		LHP1[11]	Novocastra
11		K8.60[b] [12]	Sigma
9	掌跖上皮上基层	无供应	
3	角膜上皮	AE5[13]	Biogenesis
12		无供应	
4	非角化上皮上基层细胞	6B10[14]	Novocastra/Dako
13		1C7[14]	ICN
6	过度增生表皮	LHK6B[15]	Novocastra
16	口腔黏膜	LL025[16]	Novocastra
7	单层上皮细胞及一些基底前列腺细胞	RCK105[17]	ICN/Dako
17		E3(18)	Sigma/Dako Novocastra
8	单层上皮细胞及乳腺、前列腺的腔上皮细胞	35βH11[10]	Dako
18		RGE53[19]	ICN
19	发囊角化细胞、单层上皮细胞、前列腺基底层及内腔上皮细胞、乳腺腔上皮细胞	RCK108	Dako
20	尿道伞膜细胞、梅克尔细胞	Ks20.8[21]	Novocastra/Dako
广谱角蛋白	角蛋白 1、5、6 及 18	LP34[11]	Novocastra/Dako

本表列举了角蛋白类型及其典型的组织定位，每种抗体的特异性在其右上角所列的参考文献中均有描述，非特异性交叉反应性最低的抗体方能列入本表中。

[a] 这些抗体从别的供应商处也可获得。

[b] 此抗体也称为角蛋白 10。

5(Cy5，发远红色光)有时也会用到。在有合适的过滤阻断时，这几种荧光素可以同时使用，各个图像可重叠一起观测，也可以单个观测(图 14.1)

160

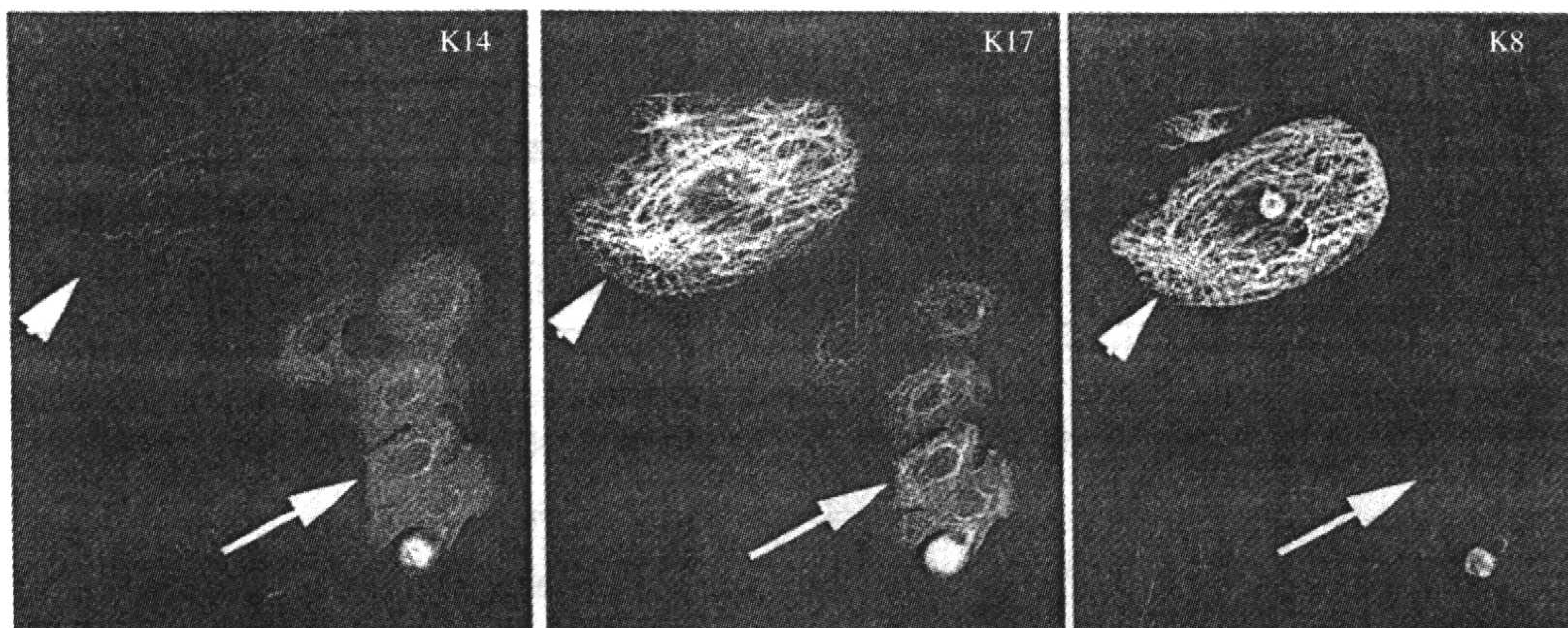


图 14.1 上皮细胞角蛋白染色用抗角蛋白 14(LLOO2,IgG3)、17(E3，IgG2b)及 8(35βH11，IgM)3 种抗体对前列腺上皮细胞进行免疫荧光染色

在盖玻片上细胞培养，生长 48h，然后按照 3.4 所描述的方法固定、染色。用标记 Cy5(抗 IgG3)、TRITC(抗 IgM)及 FITC(抗 IgM)的二抗检测一抗。如图显示，K14 染色较小的基底层样细胞(长箭头)、K8 染色较大的分化腔样细胞(短箭头)、培养中的几乎所有前列腺上皮细胞都表达 K17。在 Hg-arc Zeiss axiophot 荧光显微镜上拍照，分别储存。图像用 Adobe Photoshop(v5.0, Adobe System, San Jose,CA,USA)处理

2 材料

(1) 上皮细胞在盖玻片上铺满[见注意事项(1)、(2)]或将胰蛋白酶消化的细胞在干净的盖玻片上晾干[见注意事项(3)]。

(2) 7×PF 试剂(ICN Biomedical)。

(3) 磷酸盐缓冲液(PBS)(Life Technologies)。

(4) 10μg/mL I 型鼠尾胶原(Vitrogen 100)(Nutacon，Postbus 94,2450 AB Leimuiden，Netherlands)，用 PBS 稀释。

(5) 1∶1(*V/V*)混合的丙酮、甲醇(Merck)溶液。

(6) 过氧化物酶封闭液：100mL PBS 中加入 100μL 30%的过氧化氢(Sigma)。

(7) 抗体稀释液：含有 10%胎牛血清(FCS)(Sigma)的 L15 培养液(Life Technologies)。

(8) 直径为 140mm 的皮氏培养皿或面积为 500cm^2 的皮氏培养皿。

(9) 抗角蛋白的一抗(表 14.1)。

(10) 标记荧光素的二抗(Southern Biotechnology Association，Birmingham，AL,USA)[见注意事项(16)和(17)]。

161

(11) Vectastain® Elite ABC 试剂盒(抗小鼠或大鼠)(Novocastra)。

(12) DAB 底物试剂盒(Novocastra)(3,3′-二氨基联苯胺片剂)(Sigma)[见注意事项(4)]。

(13) 用无离子水配制的 1μg/mL 双苯甲脒 Hoechst No.33258 三盐酸化物(Sigma)。

(14) Tween-20 (Sigma)。

(15) Vectashield® 水相固定液(Novocastra)。

(16) VectaMount™ (Novocastra)或 DPX 永久固定液(Merck)。

(17) 指甲油。

(18) 苏木精。

(19) 滤纸(Whatman No.1)。

(20) 13mm 盖玻片[洗涤及灭菌方法见注意事项(1)]。

(21) 精巧的钟表镊子(5 号)。

3 方法

3.1 生长在盖玻片上的上皮细胞固定及渗透处理

(1) 选择细胞分布均匀，细胞满度较低的盖玻片。如果选择的是晾干的细胞，细胞应在盖玻片上分布均匀[见注意事项(3)]。

(2) 用 PBS 清洗培养孔 3 次，最后一次时尽可能去除残余液体。

(3) 每孔加入 1mL 1∶1 丙酮∶甲醇的混合液，在室温下孵育 2min[见注意事项(5)]。晾干细胞的固定与渗透处理的方法相同，但不用 PBS 洗涤。

(4) 弃掉甲醇∶丙酮固定液[见注意事项(6)]，用 PBS 洗 3 遍。

(5) 处理好的盖玻片可以立即染色，也可以在步骤(4)之后−70℃保存，但不要用 PBS 洗涤[见注意事项(7)]。

3.2 细胞角蛋白免疫细胞化学染色

(1) 固定或解冻盖玻片后，加入辣根过氧化物酶封闭液，室温孵育 15~30min[见注意事项(8)]。

(2) PBS 洗涤。把盖玻片浸入盛 PBS 的烧杯中，用滤纸吸干多余水分，或 PBS 清洗 3 次，孵育 5min。

(3) 用抗体稀释液室温孵育 30min，以阻断非特异性结合。

(4) 制备湿盒，把滤纸放入倒扣的直径为 140mm 或面积为 500cm^2 的皮氏培养皿中。

(5) 用铅笔在滤纸上划 2cm 的方格，并标上数字，这些数字是用来在染色过程中鉴定盖玻片的，加入足够的水使滤纸潮湿，但不要淹没滤纸。

162

(6) 用钟表镊子夹起盖玻片，每次一片，从培养板或培养碟中转移到方格中，每种抗体或稀释液至少使用两片盖玻片，另外，还要设对照组[见注意事项(9)]。

(7) 用稀释液在标记的 Eppendorf 管中稀释一抗，每 13mm 的盖玻片上可以加入 30~50μL 一抗[见注意事项(10)]。

(8) 依次吸出封闭液，然后加入稀释过的一抗，这一步要特别注意细胞类型，每一步处理都要非常小心，所加入的抗体要与方格的号码相一致。

(9) 一抗或对照液的孵育时间最少为 45min，最长为 2h。如果条件允许，可以在 4℃下孵育过夜[见注意事项(11)]。

(10) 温育结束后，吸弃一抗，按照步骤(2)洗涤盖玻片[见注意事项(12)]。

(11) 加入稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗，孵育 45min。

(12) 照产品说明书制备 DAB。每片盖玻片上加入 50μL DAB 液体，孵育 2~5min，直至有颜色反应发生[见注意事项(13)]。可以在显微镜下监视显色程度，但要注意不要污

染 DAB 溶液[见注意事项(14)]。

(13) 用过的 DAB 溶液倒入普通管子中，用漂白剂中和，然后用 3 倍的蒸馏水洗盖玻片。

(14) 如果需要复染，则加入 50μL 苏木精液，孵育 30~50min。

(15) 用蒸馏水洗涤盖玻片，晾干，用非水性固定剂固定，如 DPX 或 VectaMount，盖玻片带有细胞的一面朝下，放在显微镜载玻片上，并标记与盖玻片相同的号码。

(16) 可以立即检测制备好的盖玻片，也可以在低温避光条件下长期保存。

3.3 细胞角蛋白的免疫荧光染色

(1) 固定细胞或融化冻存的盖玻片，加入 50μL 抗体稀释液孵育盖玻片 30min，以封闭非特异性抗体的结合。

(2) 参照 3.2 的步骤(4)~(10)。

(3) 加入荧光素标记的二抗，孵育 45min[见注意事项(16)]，从此时开始，二抗对光比较敏感，所有的孵育应在暗处进行，在湿盒周围缠上箔片可有效地避光。

(4) 像前面的步骤一样洗涤盖玻片，蒸馏水洗完后，加入水性封固剂封固盖玻片，介质中含有漂白延缓剂(如 Vectashield 封固剂)。

(5) 为了长期保存，可用指甲油沿着盖玻片的周围封片，并 4℃避光存放。

163

(6) 制作好的载玻片可立即在激光共聚焦或荧光显微镜下观察，但封片后可在避光处保存数周。

3.4 细胞多种角蛋白的同时免疫荧光染色

(1) 盖玻片的制备与一种抗体染色的方法完全相同。

(2) 选择几种不同的一抗，它们是不同物种或不同类型 Ig[见注意事项(17)]。

(3) 在 Eppendorf 管中用抗体稀释液稀释所有的一抗至要求的浓度。

(4) 室温下，用一抗孵育盖玻片 45min~2h，如果条件许可，可以 4℃下过夜[见注意事项(11)]。

(5) 按照 3.2 洗涤。

(6) 用稀释好的二抗孵育盖玻片 35min~2h[见注意事项(17)]。

(7) 洗涤盖玻片，用 DNA 和 Hoechst 孵育 5min。

(8) 按照前面所述方法洗涤盖玻片，蒸馏水洗完后，加入水性封固剂封固盖玻片，该水性封固剂中含有漂白延缓剂(如 Vectashield 封固剂)。

4 注意事项

(1) 作为操作过程的一部分，盖玻片应做硅化处理，以防止彼此互相粘贴。但这对一些细胞的黏附有影响，所以在灭菌前应冲洗盖玻片。用 Bunsen 炉或微波炉，在 7 倍去污剂的弱液(0.3%)中煮沸 15min。如果用 Bunsen 炉，应用玻璃棒间断地轻轻地搅动，以使盖玻片悬浮。如果在微波炉中煮沸，则每隔 5min 搅动一次。由于盖玻片会不断地在水中翻滚、碰撞，所以应时刻注意煮盖玻片的烧杯。在 2L 容量的烧杯中加入 1L 去污剂

溶液，一次可以洗300~500片盖玻片。煮沸后，须冷却至室温，每10min搅动一次。慢慢地往烧杯中加水，水流的速度调节到使盖玻片移动，但不要让它们超出烧杯的边缘。然后用蒸馏水洗10遍，最后70%的乙醇洗2遍。在放入玻璃的培养皿前，把盖玻片取出分放在棉纸上晾干，或者放入耐热的盒子中高压灭菌。

(2) 把13mm的盖玻片[按照注意事项(1)的方法处理]放入24孔板中或均匀分布在6cm培养皿的表面，低密度种植上皮细胞(每孔含10^3~10^4个或每6cm的培养皿中含10^5个细胞)，至少生长24h。此时，细胞已经黏附，且扩展充分，可以检测角蛋白。固定细胞或者让细胞形成小克隆。要避免培养的细胞铺满，因为细胞成层后会削弱抗体进入下一层细胞的能力。如果细胞不能黏附到盖玻片上，则需要在盖玻片上预铺细胞外基质，如胶原。在铺胶原时，要把胶原I型用PBS稀释至10μg/mL，然后在盖玻片上涂上足够的胶原。37℃孵育1h，去除液体，用PBS洗3遍，像前面一样接种细胞。

164

(3) 在盖玻片上接种细胞的另一种方法是用胰蛋白酶消化细胞，等份接种在洗涤过的盖玻片上，染色之前需要在盖玻片上晾干。制备3×10^5个/mL细胞悬液，培养基含有10% FCS。每个90mm的培养皿上可放入10~15片盖玻片，每片上加入50μL细胞悬液。轻轻展开细胞悬液，放入37℃干燥炉中15~30min，直至盖玻片仅剩中央部位潮湿时为止。

(4) 有几种不同的底物可供选择，DAB可以生成不溶于水、乙醇及二甲苯的棕黑色反应物。用苏木精复染成蓝核后，DAB反应的对比度更明显。尽管市场上买到的DAB为粉末状，其片剂的形式也可以用，一块DAB可以迅速溶解形成1、5或15mL溶液。第三种，也是最容易的一种选择是液体底物试剂盒，其提供单独的DAB、缓冲液和过氧化氢溶液，这些试剂均在滴瓶中存放，另外还提供一份容易理解及操作的说明书。

(5) 一些方法推荐1∶1混合甲醇∶丙酮在-20℃下放置5~10min。此方法虽然可行，但却增加了在产生火花的冰箱里储存有机溶剂的危险性，因为这样可能造成严重的火灾，应当注意避免采用。因此，甲醇∶丙酮在染色前应立即冷却。

(6) 丙酮具有高度的易燃性，使用过的液体应作为有机溶剂废液储存，并且按照实验室安全手册处理。

(7) 样品必须缓慢融化，从-70℃取出，在PBS洗之前要达到室温，然后进行染色程序。

(8) 因为免疫细胞化学检测系统依赖过氧化物酶标记的二抗，所以阻断细胞内源性过氧化物酶的活性可增加检测方法的准确性。

(9) 无论什么情况下，应设阳性对照来检测染色程序。主要包括培养细胞或培养含有阳性抗原细胞的组织。另外，每一种二抗的使用应设有阴性对照。在可能的情况下，阴性对照应是同种、同源(纯化的抗体，上清或腹水)或相同Ig类别的不相关的抗体(识别本细胞所不表达的蛋白质)。如果没有这样的抗体，应该用抗体稀释液作为阴性对照。

(10) 如果不知道一抗、二抗的最佳工作浓度，则要用阳性样品建立曲线图，并且1∶10、1∶100、1∶1000及1∶10 000稀释一抗，二抗稀释的方法也相同。在这个范围内找到最佳稀释浓度后，浓度梯度的变化范围应变得更小，直至找到最大化染色及最低背景时的浓度。为了避免微生物污染抗体，稀释应在无菌的环境下进行，如二级层流罩。

165

(11) 一旦加入一抗，在染色完成之前，盖玻片不要变干。所以，如果在4℃下孵育，

要注意移动湿盒时不要弄翻盖玻片。

(12) 如果背景染色较深,应在洗涤液中加入去污剂(如 0.2% Tween-20)以增加洗涤的有效性。

(13) 在阴性对照背景着色前应检测最大的孵育时间。如果有阳性对照，应检测出阳性反应的最短时间。

(14) DAB 是致癌物质，所以在操作时要一直保持警惕。用过的和过量的液体要收集起来，在倒入水槽前要用氯等漂白液中和。

(15) 吉氏苏木精染色时，随着时间的延长，着色会逐渐加深。在实验前应检测最佳作用时间，本实验需要轻度染色，以免覆盖 DAB 的颜色。

(16) 选择荧光素标记的二抗时，必须使之与倒置荧光显微镜或激光共聚焦显微镜相匹配。最常与二抗相连的荧光是荧光素或罗丹明。荧光素发绿色信号，比较容易检测。但在光漂白作用下易衰退，所以在封固液中加入漂白延缓剂。罗丹明发红色信号，这种信号不易漂白，但产生较高的黑背景荧光。

(17) 只要一抗来源的品种不同(如小鼠、大鼠、兔子或绵羊)或免疫球蛋白种类不同(如 IgG、IgM)或亚种类不同(如 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3)，可以同时检测几种抗原。选择的抗体不要有交叉反应，并且二抗的供应商要详细提供特异性说明。例如，同时染色兔和小鼠一抗时，山羊抗小鼠的二抗必须不能识别兔免疫球蛋白，同时山羊抗兔的二抗必须不与小鼠免疫球蛋白有交叉反应。最常用的一对抗体是来源于兔和小鼠的抗体，然后再分别用 FITC 或 TRITC 标记的抗兔或小鼠的二抗检测。因为商业利用的抗体多数来源于小鼠，所以有时找其他品种来源的抗体比较困难。最近，小鼠 Ig 亚单位特异性二抗的产生已改善了目前的状况。目前，只要是不同亚单位的抗体，就可以同时使用几种小鼠抗体检测。如图 14.1，使用 LL002，抗角蛋白 14(IgG3)、E3，抗角蛋白 17(IgG2b)及 35βH11，抗角蛋白 8(IgM)，并且用远红、罗丹明及 FITC 标记的 Ig 型特异二抗检测。

166

(刘为敏 译 沈 政 校)

参 考 文 献

[1] Morley, S. M. and Lane, E. B. (1994) The keratinocyte cytoskeleton, p. 293-321. In *The keratinocyte handbook* (Leigh, I., Lane, E. B., and Watt, F. M., eds.). Cambridge University Press, Cambridge.

[2] Moll, R., Franke, W. W., Schiller, D. L., Geiger, B., and Krepler, R. (1982) The catalog of human keratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell.* **31**, 11-24.

[3] Hatzfeld, M. and Franke, W. W. (1985) Pair formation and promiscuity of cytokeratins: formation *in vitro* of heterotypic complexes and intermediate-sized filaments by homologous and heterologous recombinations of purified polypeptides. *J Cell Biol.* **101**,1826-1841.

[4] Nelson, W. G. and Sun, T. T. (1983) The 50- and 58-kdalton keratin classes as molecular markers for stratified squamous epithelia: cell culture studies. *J. Cell Biol:* **97**,244-251.

[5] Purkis, P. E., Steel, J. B., Mackenzie, I. C., Nathrath, W. B., Leigh, I. M., and Lane, E. B. (1990) Antibody markers of basal cells in complex epithelia. *J. Cell Sci.* **97**, 39-50.

[6] Krueger, G. G., Jorgensen, C. M., Matsunami, N., et al. (1999) Persistent transgene expression and normal differentiation of immortalized human keratinocytes *in vivo. J. Invest. Dermatol.* **112**,233-239.

[7] Stingl, J., Eaves, C. J., Kuusk, U., and Emerman, J. T. (1998) Phenotypic and functional characterization *in vitro* of a multipotent

epithelial cell present in the normal adult human breast. *Differentiation* **63**,201-213.

[8] Hudson, D. L., O'Hare, M., Watt, F. M., and Masters, J. R. W. (2000) Proliferative heterogeneity in the human prostate: evidence for epithelial stem cells. *Lab. Invest.* **80**, 1243-1250.

[9] Waseem, A., Dogan, B., Tidman, N., et a1. (1999) Keratin 15 expression in stratified epithelia: downregulation in activated keratinocytes. *J. Invest. Dermatoi.* **112**,362-369.

[10] Gown, A. M. and Vogel, A. M. (1984) Monoclonal antibodies to human intermediate filament proteins. II. Distribution of filament proteins in normal human tissues. *Am. J. Pathol.* **114**, 309-321.

[11] Lane, E. B., Bartek, J., Purkis, P. E., and Leigh, I. M. (1985) Keratin antigens in differentiating skin. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **455**,241-258.

[12] Huszar, M., Gigi-Leitner, O., Moll, R., Franke, W. W., and Geiger, B. (1986) Monoclonal antibodies to various acidic (type I) cytokeratins of stratified epithelia. Selective markers for stratification and squamous cell carcinomas. *Differentiation* **31**, 141-153.

[13] Rodrigues, M., Ben-Zvi, A., Krachmer, J., Schermer, A., and Sun, T. T. (1987) Suprabasal expression of a 64-kilodalton keratin (no.3) in developing human corneal epithelium. *Differentiation* **34**, 60-67.

[14] Van Muijen, G. N., Ruiter, D. J., Franke, W. W., Achtstatter, T., Haasnoot, W. H., Ponec, M., and W arnaar , S. O. (1986) Cell type heterogeneity of cytokeratin expression in complex epithelia and carcinomas as demonstrated by monoclonal antibodies specific for cytokeratins nos. 4 and 13. Exp. *Cell Res.* **162**, 97-113.

[15] Markey, A. C., Lane, E. B., Macdonald, D. M., and Leigh, I. M. (1992) Keratin expression in basal cell carcinomas. *Br. J. Dermatol.* **126**, 154-160.

[16] Lane, E. B., Wilson, C. A., Hughes, B. R., and Leigh, I. M. (1991) Stem cells in hair follicles. Cytoskeletal studies. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **642**,197-213.

[17] Ramaekers, F., Huysmans, A., Schaart, G., Moesker, O., and Vooijs, P. (1987) Tissue distribution of keratin 7 as monitored by a monoclonal antibody. *Exp.Cell Res.* **170**,235-249.

[18] Troyanovsky, S. M., Guelstein, V. I., Tchipysheva, T. A., Krutovskikh, V. A., and Bannikov, G. A. (1989) Patterns of expression of keratin 17 in human epithelia: dependency on cell position. *J. Cell Sci.* **93**,419-426.

[19] Ramaekers, F., Huysmans, A., Moesker, O., Kant, A., Jap, P., Herman, C., and Vooijs, P. (1983) Monoclonal antibody to keratin filaments, specific for glandular epithelia and their tumors. Use in surgical pathology. *Lab. Invest.* **49**, 353-361.

[20] Kwaspen, F. H. L., Smedts, F. M. M., Broos A., Bulten, H., Debie, W. H. M., and Ramaekers, F.C.S. (1997) Reproducible and highly sensitive detection of the broad spectrum epithelial cell marker keratin 19 in routine cancer diagnosis. *Histopathol.* **31**,503-516.

[21] Moll, R., Lowe, A., Laufer, J., and Franke, W. W. (1992) Cytokeratin 20 in human carcinomas. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies. *Am. J. Pathol.* **140**, 427-447.

169

第15章　上皮细胞的整联蛋白

Joachim Rychly

1　引言

整联蛋白受体介导细胞黏附于细胞外基质或其他细胞上,在执行包括生长、分化、存活及组织构建等各种生物功能中，扮演着重要的角色。整联蛋白是一种异二聚体的跨膜蛋白，由一个α亚基和一个β亚基构成，亚基的不同组合决定了结合的特异性[1]。在上皮细胞，例如，角化细胞中，表达不同的β1-整联蛋白，如β1α2、β1α3 和β1α5。此外，β4α6是一个完整的半桥粒的组成部分，这个半桥粒通过特异的黏附连接与基底膜相连的[2]。上皮细胞通常是具有极性的，并且单层上皮细胞底部和顶部的细胞表面通过紧密连接分隔。根据对连续培养的上皮细胞检测[3~5],这种极性也与整联蛋白在底部区域的分布相关。为了探明不同整联蛋白受体的生物功能,就有必要研究其表达强度和在细胞表面的分布,包括极性、成簇性或与细胞表面其他蛋白质的共同分布[6]。免疫荧光技术是分析上皮细胞中整联蛋白表达和定位的一种合适的手段。针对不同β和α整联蛋白亚基的各种抗体都可从许多公司买到。与连续细胞培养中基底部整联蛋白的表达不同，在传代细胞培养中，整联蛋白不仅在底部而且在顶部表面表达。固定法被用于分析胞膜完整细胞中的整联蛋白，或者与渗透膜技术相结合，用于检测侧面或底部区域(如非渗透细胞不易接近的表面区域)的整联蛋白表达。为了检测受体在细胞表面各种区域的分布，建议使用激光共聚焦显微镜，因为它可以对细胞进行水平的和垂直的光学剖面观察。整联蛋白受体的定量估计可在细胞单层中进行，也可以通过流式细胞仪在悬浮的上皮细胞中测量[7,8]。这里所描述的实验步骤和注意事项，主要是基于用猿病毒 40(SV40)永生化的上皮细胞系所获得的经验，此细胞系是由肝脏细胞获得的[3]。

170

2　材料

(1) 皮氏塑料培养皿。

(2) 载玻片和盖玻片(8mm×25mm 或 8mm×60mm)。

(3) 细胞培养液：含 10%胎牛血清(FCS)的 DMEM 培养液。

(4) CO_2 培养箱。

(5) 磷酸盐缓冲液(PBS)，pH7.2~7.4: 含有 137mmol/L NaCl，2.7mmol/L KCl，4.3mmol/L Na_2HPO_4 和 1.4mmol/L KH_2PO_4。

(6) 湿盒：用一个带盖的皮氏玻璃培养皿，此培养皿应该大于生长细胞的培养皿。在湿盒底部放一张浸有蒸馏水的滤纸用来保持湿度，培养皿放在滤纸上面。

(7) 带吸头的可调移液器。

(8) 多聚甲醛(PFA)溶液(1%、2%和 4%)：溶液应新鲜制备。在试管中加入所需量的

PFA 于 2mL 的 PBS 中。为了溶解 PFA，加入几滴 1mol/L 的 NaOH 并稍微加热溶液。然后加入 8mL PBS 并将 pH 调整至 7.2~7.4。

(9) 戊二醛。

(10) 整联蛋白亚基的单克隆抗体(β1、α1、α2、α4 和 α5)。

(11) 荧光标记的二抗：异硫氰酸盐荧光素(FITC)标记的抗小鼠抗体。

(12) ^{125}I-标记的二抗：绵羊抗小鼠 IgG，19~74Bq/mmol(Amersham)。

(13) 封片液：30g 甘油，12g 聚乙烯乙醇(分子质量 30~70kDa)，30mL 蒸馏水，0.5g 酚。混匀甘油、水和苯酚。在连续搅拌下加入聚乙烯乙醇。溶液在 40~45°C 的水浴中放置 12h。加入 60mL 0.1mol/L 的 Tris，pH8.5。此培养液应在 4℃储存。

(14) Triton X-100。

(15) 2mmol/L EGTA 溶于无 Ca^{2+}的 DMEM 中。

(16) 96 孔培养板。

(17) 0.05%的胰蛋白酶，0.02%的 EDTA 溶液。

(18) 巴斯德吸管。

(19) 真空水泵。

(20) 低速离心机。

(21) 聚苯乙烯圆底试管(12×75)(Falcon，型号 2052)。

(22) Facsflow 溶液(Becton Dickinson)。

(23) 微型混合器。

(24) 激光共聚焦显微镜(LSM5 型；Carl Zeiss)。

171

(25) 流式细胞计数仪(Facscan；Becton Dickinson)。

(26) 多晶体(Multicrystal)伽玛计数器(Berthold，型号 LB2111-R)。

3 方法

3.1 进行显微观察的细胞传代培养

为了用显微镜观察整联蛋白受体，细胞培养在一个盖玻片上。

(1) 在 35mm(用于 8mm×25mm 盖玻片)或 60mm(用于 8mm×60mm 盖玻片)的塑料细胞培养皿中放入盖玻片[见注意事项(1)]。

(2) 加入 2mL 细胞培养液。

(3) 加入皮氏培养皿的细胞数依赖于细胞的生长速度。用永生化的 500μL 上皮细胞悬液(含 5×10^5 个细胞)进行传代培养。如果是铺满培养，则加入 4×10^6 个细胞[见注意事项(2)]。

(4) 在 37℃的 CO_2 培养箱中培养细胞 24h。

(5) 必须控制细胞单层的密度。为了分析传代培养，大部分细胞应该像单个细胞一样黏附。如果分析铺满培养的细胞，整个单层应该形成细胞-细胞间接触。如果细胞没有形成铺满的单层，这些细胞应该再培养 1d。

3.2 检测非渗透细胞中整联蛋白的细胞准备

为了分析与抗体结合的整联蛋白，例如，传代培养细胞背面的整联蛋白，采用固定法可保留完整的细胞膜。

(1) 细胞培养在盖玻片上(铺满或非铺满的)后，用吸管从皮氏培养皿中小心地移去细胞培养液。

(2) 用 1mL PBS 洗皮氏培养皿 3 次。

(3) 为了进一步准备，盖玻片应保留在皮氏培养皿中。在准备过程的任何步骤均不要让细胞干燥。

(4) 将放有盖玻片的皮氏培养皿放入湿盒中。

(5) 为固定细胞，加入 100μL 1%的 PFA / 0.025%的戊二醛并在室温下孵育 10min[见注意事项(3)]。

(6) 用 1mL PBS 漂洗 3 次。

(7) 与抗体孵育：小鼠单克隆抗体适用于检测范围很广的各种整联蛋白亚单位。这些抗体的浓度应做适当调整。当使用商品化抗体(如从 Immunotech 购得)时，蛋白质浓度为 0.2mg/mL，通常合适的稀释比是 1∶6。加 50μL 的稀释抗体至盖玻片上，在湿盒中室温下孵育 30min。

(8) 用 1mL PBS 漂洗 3 次。

(9) 细胞用荧光标记的二抗一起孵育，例如，应用 FITC-标记的绵羊-抗小鼠的 IgG 片段。加入 50μL 按 1∶16 稀释的二抗，室温放置 30min。

(10) PBS 漂洗。

(11) 用 2% PFA 进行后固定[见注意事项(5)]。

(12) 用封片液包埋盖玻片上的细胞。所用的包埋液在 24h 内变成固体。在干净载玻片上加 50μL 的封片液，将具有细胞单层的盖玻片放在载玻片上，使细胞单层朝向固定液[见注意事项(6)]。

3.3 检测可渗透细胞中整联蛋白的细胞准备

在铺满的单层中，在基部表面的整联蛋白与细胞外基质相互作用，而侧面的整联蛋白在细胞-细胞间相互作用。在这些位点上，它们不能与抗体接触，在与抗体孵育之前，将固定法与可渗透技术结合起来是很有必要的。

(1) 在皮氏培养皿中的盖玻片上培养细胞。

(2) 用 PBS 漂洗细胞并为以后的孵育步骤准备湿盒。

(3) 加入 200μL 4%的多聚甲醛，室温放置 10min。

(4) 用 1mL PBS 漂洗细胞 2 次。

(5) 用 0.1%的 Triton X-100 室温下孵育细胞 1h[见注意事项(7)]。

(6) 用 1mL PBS 漂洗细胞 2 次。

(7) 与抗体孵育，并按上面所述的方法(见 3.2)完成进一步的程序。

3.4 与侧面整联蛋白的接触

为了研究在铺满的培养上，细胞侧面整联蛋白与不同配基的相互作用，可通过整联蛋白来刺激细胞或进行特殊分析，这是使它们接触所必需的。因此，有必要切断细胞-细胞间的连接却没有将细胞与底物分开。

(1) 在皮氏培养皿中的盖玻片上制备铺满的细胞培养。

(2) 用 PBS 漂洗细胞 2 次。

(3) 在 4℃下用含 2mmol/L EGTA、无 Ca^{2+}的 DMEM 孵育细胞单层 20min[见注意事项(4)]。

(4) 与抗整联蛋白抗体孵育以检测整联蛋白，或与其他的配基在含 EGTA 的溶液中孵育。

3.5 整联蛋白表达的定量分析

3.5.1 单层中的整联蛋白分析

为了定量分析结合在细胞单层中的整联蛋白的表达，可以应用放射性标记的二抗。为了检测细胞-细胞连接中的整联蛋白，在按前面描述的方法与整联蛋白抗体孵育之前，要分开细胞连接。

173

(1) 在 96 孔细胞培养板的单独孔中准备培养(每 2 个孔为一组)。

(2) 如 3.2 所述，与整联蛋白单克隆抗体一起孵育。

(3) 在 PBS 中漂洗细胞。

(4) 与 20μL ^{125}I 标记的绵羊抗小鼠 IgG 孵育，稀释 1∶40，室温放置 20min。

(5) 用 PBS 漂洗 3 次。

(6) 用多晶体伽玛计数器测量放射活性。至少应该做 3 次重复测量。

3.5.2 悬浮上皮细胞中整联蛋白的分析

为测量上皮细胞中整联蛋白定量表达的全貌，悬浮细胞的流式细胞分析是一项合适的技术。

(1) 在 35mm 皮氏塑料培养皿或 10mL 细胞培养瓶中制备上皮细胞的铺满或传代单层培养。

(2) 用 PBS 漂洗细胞单层。

(3) 用 0.05%胰蛋白酶-0.02% EDTA 从底物上分离细胞[见注意事项(8)和(9)]。加入适当体积的胰蛋白酶溶液使之完全覆盖细胞单层。

(4) 细胞放置在 CO_2 培养箱中 3min。

(5) 通过用 PBS 漂洗皮氏培养皿或细胞培养瓶，将分离的细胞收集在一个试管中。

(6) 在试管中加入 2mL PBS，400*g* 离心 10min，洗涤细胞 2 次。用吸管移去上清液并在 PBS 中重新悬浮细胞。重复离心并在 PBS 中悬浮细胞[见注意事项(10)]。

(7) 与抗整联蛋白抗体孵育，在 20μL 约含 5×10^5 个细胞的细胞悬液中加入 20μL 未经稀释的抗整联蛋白抗体。

(8) 室温孵育 30min。

(9) 在 PBS 中漂洗细胞 1 次。

(10) 在细胞沉淀中加入 20μL 未稀释的 FITC 标记的绵羊-抗小鼠抗体并小心混匀。

(11) 细胞在室温下避光孵育 30min。

(12) 加入 2mL PBS，并用 PBS 漂洗细胞 2 次。

(13) 为了用流式细胞计数仪检测，加入 0.5mL Facsflow 溶液，然后用流式细胞仪检测。

3.6 激光共聚焦显微镜

激光共聚焦显微镜和流式细胞仪是用来分析荧光染色后上皮细胞中整联蛋白的主要技术。为了解这些技术细节，可参考使用手册[9~12]。在此处以及 3.7 中，介绍了应用这些技术分析上皮细胞中整联蛋白的一些主要方法。

174

(1) 大多数激光共聚焦显微镜包括一个倒置荧光显微镜，用于分析培养在细胞培养皿中或预先准备的盖玻片上的活细胞。为了对包埋在载玻片上的盖玻片细胞进行全面分析，必须转动载玻片。

(2) 为分析整联蛋白的分布，通常使用 63×的物镜。建议用 63×/1.25 的加油 Plan-neofluar 物镜，它能用来详细分析个别细胞上整联蛋白的表达。

(3) 为了分析传代培养细胞中整联蛋白的分布，从而证明整联蛋白在整个细胞表面表达，有必要应用 3 个水平面的光学部分：分别在细胞的上面、中间和底部。层之间的距离约 3μm，整个细胞高度为 6μm。用共聚焦可以显示约 20μm 的针眼尺寸，从而获得细胞顶部表面和细胞底部黏附位点上整联蛋白表达的图像。

(4) 虽然用丙酮或 Triton X-100 进行了可渗透性处理，但位于底部的受体荧光表达相对较弱。因此，为了显示受体的分布，需要一个能增强亮度和对比度的数字信号。

(5) 为了分析铺满培养，要求用垂直方向的光学切割来显示整联蛋白在细胞-细胞边缘连接处的表达。首先，应对背侧表面进行水平扫描，然后在 *xy* 坐标平面上做一条切线，切线穿过一定数目的细胞-细胞连接。沿着这条线，扫描 *z* 方向就能获得细胞垂直面的图像。

3.7 流式细胞计数法

(1) 流式细胞仪检测需要悬浮状态的单个细胞。通常，用流式细胞仪检测上皮细胞与检测分离的血细胞方法相同。不过，正常的贴壁细胞，如上皮细胞，倾向于成簇悬浮。因此，检测应在细胞制备后的 2h 内进行。在检测前用吸管或混旋器小心地重新悬浮细胞。如果出现成簇现象，在检测前用筛网过滤细胞。

(2) 为了进行流式细胞仪检测，首先调整仪器至能在显示屏上看到分散细胞的前面/侧面。通常，可获得相对同质的细胞群，但可能被一些碎片和成簇细胞所干扰。注意，上皮细胞比血细胞大。因此，仪器设置为正面分散探测器这一点与血细胞检测相比有很大的不同。

(3) 流式细胞仪检测荧光与其他细胞相同。首先检测仅仅与荧光标记的二抗孵育的对照组细胞。调整荧光检测器使荧光成点状定位在基线上。然后用同样的仪器设置测定所有样品(通常检测 10 000 个细胞)。

175

(4) 为了进行分析，细胞首先被定位在正面/侧面。代表整联蛋白表达的荧光强度用柱形图表示。

4 注意事项

(1) 通常，细胞培养前需用基质蛋白包被盖玻片。I 型胶原(由大鼠尾制备；Harbor Bio-Products，Norwood，USA)是一种合适的包被蛋白。胶原先用稀乙酸稀释(1∶1000 *V/V*)。以 0.2mg/mL 的浓度在 8mm×25mm 的盖玻片上加 20μL(50μL 包被 8mm×60mm 的盖玻片)。在灭菌盒中将盖玻片上的胶原晾干 2h。

(2) 为了制备在盖玻片上的培养，细胞直接用吸头滴加在盖玻片上，以便细胞主要黏附在盖玻片上而不是皮氏培养皿的底部。通常为了分析铺满的细胞培养，应在铺满的第一天就进行分析。当铺满的单层培养较长时间时，细胞形态发生改变并且黏附性更强。因此，为了用流式细胞仪检测，用胰蛋白酶较长时间分离细胞可能损伤细胞膜。

(3) 也可使用 4%的 PFA 溶液。

(4) 用无 Ca^{2+}培养液破坏细胞-细胞间连接将导致连接断开而不丧失去与底物的黏附。破坏连接后标记的整联蛋白显示整联蛋白在侧面保持相对稳定的定位而不移到顶部表面。

(5) 当为其后几天显微镜观察而准备细胞时，则不需要用 PFA 进行后固定，但为了以后样品的检测，仍推荐进行后固定以稳定荧光。

(6) 将盖玻片包埋在载玻片上时应防止产生气泡，其方法是先将盖玻片放在封片液滴的边缘，然后慢慢放下。

(7) 作为用 PFA 和 Triton X-100 实现细胞可渗透性的一种替代程序，也可以用丙酮固定并实现细胞的可渗透性。加 50μL 冷丙酮(−20℃)至细胞单层上 5min，然后用 PBS 漂洗细胞 3 次。

(8) 为了将细胞与底物分开以便进行流式细胞分析，胰蛋白酶-EDTA 是最合适的分离剂。笔者也曾试验过其他酶和机械方法，发现胶原酶和分散酶分离黏附细胞的效果较差，而机械分离显示大量细胞受损。

(9) 我们发现整联蛋白受体能对抗 0.05%胰蛋白酶处理。为了证明这一点，我们试验了是否胰蛋白酶能降低整联蛋白受体的密度。发现胰酶消化中可能丢失的受体，能在传代培养的含血清的完全细胞培养液中得到恢复。因此，用胰酶消化上皮细胞，PBS 漂洗，然后用流式细胞仪检测受体的表达。作为对照，等量细胞在含 10%血清的完全培养液中于 37℃继续培养 4h。胰酶消化后在完全培养液中培养的细胞整联蛋白表达与胰蛋白酶消化后立刻进行分析的细胞相同，这些结果显示胰蛋白酶消化不会损害整联蛋白的表达。

176

(10) 试管中漂洗细胞是一个非常简单的过程，但是我们观察到初学者在这个漂洗过程往往丢失大量细胞。细胞离心后，移去上清液很关键。用真空水泵显然是最合适的。将与泵连接的巴氏吸管放在试管内壁，位于细胞沉淀上几毫米，以便吸出 PBS。

(11) 流式细胞仪检测的抗体浓度必须经过实验。通常，对于商品化获得的抗体来说，10μL 或 20μL 的未稀释的抗体是合适的。

(曹宇静 译　段恩奎 校)

参 考 文 献

[1] Hynes, R.O. (1992) Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**,11-25.

[2]Watt, F. M. and Hertle, M. D.(1994) Keratinocyte integrins, p.156-164.In *The keratinocyte handbook* (Leigh, I. M., Lane, E. B., and Watt, F. M., eds.). Cambridge University Press, Cambridge.

[3] Henning,W.,Bohn, W., Nebe, B.,Knopp,A.,Rychly,J.,and Strauss,M.(1994)Local increase of beta 1-integrin expression in cocultures of immortalized hepatocytes and sinusoidal endothelial cells.*Eur.J.Cell Biol.* **65**, 189-199.

[4] Carter,W.G.,Wayner,E.A.,Bouchard,T.S.,and Kaur,P.(1990)The role of integrins alpha 2 beta 1 and alpha3 beta 1 in cell-cell and cell-substrate adhesion of human epidermal cells . *J.Cell Biol.* **110**,1387-1404.

[5] Marchisio,P.C.,Bondanza,S.,Cremona,O.,Cancedda,R.,and De Luca,M.(1991)Polarized expression of integrin receptors(alpha 6 beta 4,alpha 2 beta1,alpha 3 beta 1,and alpha v beta 5)and their relationship with the cytoskeleton and basement membrane matrix in cultured human keratinocytes.*J.Cell Biol.***112**,761-773.

[6] Nebe,B.,Sanftleben,H.,Pommerenke,H.,Peters,A.,and Rychly,J.(1998)Hepatocyte growth factor enables enhanced integrin-cytoskeleton linkage by affecting integrin expression in subconfluent epithelial cells.*Exp.Cell Res.***243**,263-273.

[7] Nebe,B.,Bohn,W.,Sanftleben,H.,and Rychly,J .(1996) Induction of a physical linkage between integrins and the cytoskeleton depends on intracellular calcium in an epithelial cell line. *Exp. Cell Res.* **229**,100-110.

[8] Nebe,B.,Bohn,W.,Pommerenke,H.,and Rychly,J.(1997)Flow cytometric detection of the association between cell surface receptors and the cytoskeleton.*Cytometry* **28**,66-73.

[9] Jaroszeski,M.J.and Heller,R.,eds.(1998)*Flow cytometric protocols.*Humana,Totowa,NJ.

177 [10] Ormerod,M.G.(ed.)(2000)*Flow cytometry:a pratical approach,3rd ed.*Oxford University Press,Oxford.

[11] Paddock,S.W.,ed.(1999) *Confocal microscopy methods and protocols.* Humana, Totowa, NJ.

[12] Pawley,J.B.,ed.(1995)*Handbook of biological confocal microscopy,2nd ed.* Olenum Press, New York.

第 16 章　人类正常表皮角质细胞在无血清培养系统中的分离、培养和分化

179

Sebastian Zellmer　Dieter Reissig

1　引言

表皮位于人类皮肤的外表层。角质细胞①占表皮细胞的 90%以上。角质细胞来源于基底层干细胞。基底层的角质细胞不断分裂、分化，迁移至表皮外层，形成角质层。角质层由多层脂质以及中间包埋的终末分化的角质细胞构成[1]。这些终末分化的角质细胞最终以脱屑的方式从皮肤表面脱离。因此，角质细胞是应用基因疗法[2,3]治疗异常皮肤剥脱[4,5]的理想靶细胞。此外，由于角质细胞是一种分泌型细胞[6]，因此它还可能被用于分泌因子的全身运输[7,8]。

Rheinwald 和 Green 等[9]进行的早期研究发现，人类表皮角质细胞能够在体外被分离、培养。这样一来，人们就可以在体外进行有关角质细胞形态、生化特性以及分化的研究[10~14]。此外，由表皮干细胞培养角质细胞也使体外获得重建的人类表皮成为可能。重建的表皮可用于研究表皮发育[13]，可以作为药理学研究的表皮体外模型[15,17]，或者作为自体移植物用于临床治疗[18]。

这里，我们介绍一种能够快速简便地分离人类正常表皮角质细胞，并在无血清培养系统中培养重建表皮的方法。

2　材料

180

2.1　溶液

(1) Betaisodona®溶液(Mundipharma, Limburg, Germany)，一种消毒用的聚乙烯吡咯-碘复合物，使用时无需稀释。

(2) 角质细胞生长培养基(KGM)：500mL 角质细胞基础培养基，添加以下成分：0.1μg/mL 人表皮生长因子(hEGF)，5μg/mL 胰岛素，0.5μg/mL 氢化可的松，50μg/mL 庆大霉素，50μg/mL 两性霉素，30μg/mL 牛脑垂体提取物(BPE)。可以买到配置 KGM 培养基的所需成分的即买即用试剂盒(KGM® Bulletkit®,Clonetics,cat. no. CC-3111)。

(3) 无菌磷酸盐缓冲液(PBS)。

(4) 含 GlutaMAX I™，1g/L 葡萄糖，丙酮酸钠的 DMEM。可从公司直接购买(Life Technologies)[见注意事项(1)]。

(5) 胎牛血清替代品 Ultroser®G (Life Technologies)[见注意事项(2)]。使用前每 50mL

① keratinocyte,也被称为角质形成细胞。——译者注

DMEM 培养基添加 1mL Ultroser G。

(6) 2.5mg/mL Dispase II(Boehringer Mannheim)，溶于 KGM 培养基中，该溶液可在 4℃保存 1~2 周不失活。

(7) 0.25%EDTA，溶于 PBS，−18℃储存。

(8) 0.25%胰酶溶液(4U/mg) (Serva,Heidelbreg,Germany)，溶于 PBS，−18℃储存。

(9) 台盼蓝溶液。

(10) 15mmol/L $CaCl_2$ 浓缩液，灭菌后溶于 KGM 培养基，4℃储存。

2.2 设备

(1) 37℃、5%CO_2、95%空气的培养箱。

(2) 空气层流室(净化型)。

(3) 离心力 666*g*，慢制动闸(减速度为 2)的离心机(如 Sigma3-12)。

(4) 血细胞计数器。

(5) 具有 5~20 倍放大功能的倒置显微镜。

(6) 细胞培养瓶(25cm^2)。

(7) 适用于 24 孔培养板的，孔径为 0.45μm 的透明细胞培养小室(Falcon)。

(8) 24 孔培养板(Falcon)。

(9) 无菌剪刀和镊子。

(10) 过滤用的 40 目细胞筛(Falcon)。

3 方法

3.1 皮肤的准备

(1) 为了安全运输，迅速将割下的包皮置于无菌 PBS 液中(4℃)[见注意事项(3)]。

(2) 用剪刀尽可能去除皮下脂肪组织。

(3) 室温下，将皮肤在 Betaisodona®溶液中孵育 15min。

(4) 在无菌 PBS 中洗 3 次。

181

(5) 将皮肤置于无菌培养皿中，切成小块(约 5mm×5mm)。

(6) 将皮肤置于 15mL 分散酶溶液中，4℃，过夜。

3.2 人表皮角质细胞的分离

(1) 将皮肤块置于培养皿中，加入少量 PBS 以防止干燥。

(2) 用无菌镊子将表皮自真皮分离[见注意事项(5)]。操作时，要始终将组织浸于 PBS 中。

(3) 37℃下，将表皮在 5mL 胰酶-EDTA(1∶1；*V/V*)混合液中消化 15min。

(4) 每隔 5min 摇动消化液，以提高游离基底层角质细胞的数量。

(5) 加入 10mL Ultroser G 于 DMEM 溶液[见注意事项(1)]。

(6) 666*g* 离心 5min。

(7) 角质细胞重新悬浮于 5mL KGM 培养基中。

(8) 用细胞筛过滤细胞悬液。

(9) 计数角质细胞，并用台盼蓝溶液判定细胞活力。每 $25cm^2$ 培养瓶接种 1.25×10^5 个细胞(大约 5000 个/cm^2)，培养瓶中 KGM 培养基的终体积大约为 4mL。

(10) 培养液每周更换 3 次(每 2 天一次)。

3.3 人表皮角质细胞的传代

(1) 选择增殖力高的角质细胞克隆进行传代[见注意事项(8)]。

(2) 将细胞用无菌 PBS 洗 2 次。

(3) 再用胰酶-EDTA(1∶1 *V*/*V*)混合液洗 2 次，吸出培养瓶中多余的消化液。

(4) 37℃，消化 5min。

(5) 加入 10mL Ultroser G 于 DMEM 溶液[见注意事项(1)]，666*g* 离心 5min。

(6) 用 5mL KGM 培养基重新悬浮细胞，计数后，每 $25cm^2$ 培养瓶接种 1.25×10^5 个细胞(大约 5000 个/ cm^2)，培养瓶中 KGM 培养基的终体积大约为 4mL。

(7) 培养液每周更换 3 次(每 2 天一次)。

(8) 数日后，细胞将在培养瓶中长成单层，即可用于下一步实验[见注意事项(9)]。

3.4 将具有高增殖潜能的正常人类表皮角质细胞分化为重建表皮

(1) 按上面描述的[见 3.3 步骤(2)~(6)]方法收集细胞。

(2) 将细胞培养小室置于 24 孔培养板中，加入大约 500μL KGM 培养基。

(3) 在小室内按 5.5×10^5 个/cm^2 的密度接种细胞，确认培养基没过细胞[见注意事项(10)]。

(4) 3d 后移去载体中的培养基，将小室转移到新的培养板，加入 KGM 培养基，并添加 1.5mmol/L $CaCl_2$[见注意事项(11)]。

(5) 3~4d 内，这些角质细胞会分化形成细胞多层(三维重建的表皮)，此培养物可以被用于诸如药物动力学的研究[16]。 182

(6) 由于气-液界面可能发生污染，建议每天检查培养物，及时清除被污染的细胞培养小室。

(7) 培养液每周更换一次[见注意事项(12)]。

4 注意事项

(1) 由于 Ultroser 的价格较 KGM 培养基便宜，因此用添加了 Ultroser 的 DMEM[见 2.1 步骤(5)]终止胰酶的消化[见 3.2 步骤(5)和 3.3 步骤(3)]。

(2) 可以将 Ultroser G(2g)溶于 20mL 无菌蒸馏水，分装成 1mL 的储存液，保存在 −18℃。

(3) 建议从 3~10 岁儿童的包皮中分离角质细胞，这些细胞不含毛囊，也没有皮下脂肪层，而且增殖迅速。不要使用发炎的皮肤，由这样的材料获得的细胞中会含有大量其他的细胞。

(4) 皮肤也可以在 37℃条件下孵育 2h，但细胞产量会降低。

(5) 分散酶 II 溶液会破坏细胞的半桥粒结构。建议用镊子夹住皮肤一端，再用另一把镊子很容易地剥下表皮，像从纸上撕掉标签一样。

(6) 过滤步骤可以使细胞与表皮团块分开。此外，可以增加来源于表皮干细胞的小体积角质细胞的数目[19]。

(7) 角质细胞会在 0.5~2h 内贴附于培养瓶壁，并开始伸展。2~3d 内，细胞开始分裂。这一过程取决于皮肤供体的年龄和皮肤取自的部位。只有小的角质细胞会分裂并形成克隆[19]。体积较大的角质细胞会很快停止分裂[20]。为了得到更多的细胞克隆，就需要按要求的密度接种细胞。为增加干细胞来源角质细胞的数量，应该在接种细胞 30min 后马上更换培养基，这是因为基底层细胞贴壁较快[21]。

(8) 4~5d 后，会出现许多细胞克隆或集落。当集落已经包含有 50~60 个细胞时，应立即收集细胞。

(9) 仔细检查培养物是非常重要的。因为培养物由 3 种类型的角质细胞克隆组成：完全克隆(holoclone)、部分克隆(meroclone)和旁侧克隆(paraclone)[20]。虽然完全克隆有丝分裂率较低，但具有很高的增殖潜能。培养一周后，单个角质细胞开始分化。

(10) 必须保证足够高的细胞密度，以便贴附到细胞培养小室底部的角质细胞生长至融合。

(11) 向 KGM 培养基中添加 1.5mmol/L $CaCl_2$ 时，可以使用 $CaCl_2$ 储存液(见 2.1)。高浓度的 $CaCl_2$ 将会促进角质细胞的分化。培养小室必须是空的，并且培养孔中培养基的高度不能超过小室里的细胞层。如果培养孔中的培养基太多，产生的静水压力会干扰多层细胞结构的形成。如果培养孔中的培养基不足，又会导致细胞干燥并死亡。我们发现，在 24 孔培养板中每孔添加 200μL KGM 培养基已经足够。

183

(12) 在此培养阶段，角质细胞停止生长，发生分化，形成复层上皮。这时，培养基的更换不要太频繁，以降低污染发生的可能性。

致谢

感谢 J. Salvetter 对于手稿的仔细阅读。本项工作得到 Deutsche Forschungsgemeinschaft (Grant Nos. Re 1426/1-1 和 Ze 376/1-1)的部分资助。

(周家喜 译　张　键　王　莉 校)

参 考 文 献

[1] Landmann L. (1988) The epidermal permeability barrier. *Anat. Embryol.* **178**,1-13.

[2] Hengge U. R., Walker P. S., and Vogel J. C. (1996) Expression of naked DNA in human, pig, and mouse skin. *J. Clin. Invest.* **97**, 2911-2916.

[3] Levy, L., Broad, S., Zhu, A. J., Carroll, J. M., Khazaal, I., Peault, B., and Watt, F. M. (1998) Optimised retroviral infection of human epidermal keratinocytes: long-term expression of transduced integrin gene following grafting on to SCID mice.*Gene Ther.* **5**, 913-922.

[4] Choate, K. A., Kinsella, T. M., Williams, M. L., Nolan, G. P., and Khavari, P. A. (1996) Trans glutaminase 1 delivery to lamellar ichthyosis keratinocytes. *Hum.Gene Ther.* **7**,2247-2253.

[5] Vailly,J., Gagnoux-Palacios, L., Dell' Ambra, E., et al. (1998) Corrective gene transfer of keratinocytes from patients with

junctional epidermolysis bullosa restores assembly of hemidesmosomes in reconstructed epithelia. *Gene Ther.* **5**, 1322-1332.

[6] Katz, A. B. and Taichman, L. B. (1999) A partial catalog of proteins secreted by epidermal keratinocytes in culture,*J.Invest. Dermatol.* **112**, 818-821.

[7] Meng, X., Sawamura, D., Tamai, K., Hanada, K., Ishlda, H., and Hashlmoto, I. (1998) Keratinocyte gene therapy for systemic diseases. Circulating interleukin 10 released from gene-transferred keratinocytes inhibits contact hypersensitivity at distant areas of the skin. *J. Clin. Invest.* **101**, 1462-1467.

[8] White, S. J., Page, S. M., Margaritis, P., and Brownlee, G.G. (1998) Long-term expression of human clotting factor IX from retrovirally transduced primary human keratinocytes *in vivo. Hum. Gene Ther.* **9**, 1187-1195.

[9] Rheinwald, J. G. and Green, H. (1975) Serial cultivation of strains of human eipidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* **6**, 331-344.

[10] Vicanova, J., Boelsma, E., Mommaas, A. M., et al. (1998) Normalization of epidermal calcium distribution profile in reconstructed human epidermis is related to improvement of terminal differentiation and stratum corneum barrier formation. *J.Invest. Dermatol.* **111**, 97-106.

[11] Ponec, M. (1991) Reconstruction of human epidermis on de-epidermized dermis: expression of differentiation-specific protein markers and lipid composition. *Toxicoi. In Vitro* **5**, 597-606.

184

[12] Vecchini, F., Mace, K., Magdalou, J., Mahe, Y., Bernard, B. A., and Shroot, B. (1995) Constitutive and inducible expression of drug metabolizing enzymes in cultured human keratinocytes. *Br. J. Dermatol.* **132**, 14-21.

[13] Gibbs, S., Boelsma, E., Kempenaar, J., and Ponec, M. (1998) Temperature sensitive regulation of epidermal morphogenesis and the expression of cornified envelope precursors by EGF and TGF alpha. *Cell Tissue Res.* **292**, 107-114.

[14] Harris, I. R., Farrell, A., Memon, R. A., Grunfeld, C., Elias, P. M., and Feingold, K. R. (1998) Expression and regulation of mRNA for putative fatty acid transport related proteins and fatty acyl CoA synthase in murine epidermis and cultured human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **111**, 722-726.

[15] Michel, M., L'Heureux, N., Auger, F. A., and Germain,L. (1997) From newborn to adult: phenotypic and functional properties of skin equivalent and human skin as a function of donor age. *J. Cell. Physiol.* **171**, 179-189.

[16] Zellmer, S., Reissig, D., and Lasch, J. (1998) Reconstructed human skin as model for liposome-skin interaction. *J. Contr. Rel.* **55**, 271-279.

[17] Ponec, M. (1992) *In vitro* cultured human skin cells as alternatives to animals for skin irritancy screening. *Int. J. Cosm. Sci.* **14**, 245-264.

[18] Pellegrini, G., Bondanza, S., Guerra, L., and de Luca, L. M. (1998) Cultivation of human keratinocyte stem cells: current and futureclinical applications. *Med. Biol. Eng. Comput.* **36**, 778-790.

[19] Barrandon, Y. and Green,H. (1985) Cell size as a determinant of the clone-forming ability of human keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 5390-5394.

[20] Barrandon, Y. and Green, H. (1987) Three clonal types of keratinocytes with different capacities for multiplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 2302-2306.

[21] Watt, F. M. (1998) Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **353**, 831-837.

185

第 17 章　临床应用培养的自体上皮细胞治疗烧伤和皮肤表面毁损

Norio Kumagai

1　引言

大面积烧伤患者的创面很难被自身的皮肤覆盖。因此，多种材料，如异体皮肤、猪皮以及人造皮肤被用作创面覆盖物。但是，在这些覆盖物中，只有自体来源的皮肤能够长期存活，并覆盖创面。O'Connor 等成功地进行了首次自体培养上皮移植，用来覆盖烧伤创面[1]。自体培养上皮移植物能够长期有效地覆盖创面，是目前被广泛应用的治疗各种烧伤的有效方法之一。自 1985 年以来，我们一直从事移植培养上皮的工作。我们采用自体或者异体培养上皮移植治疗皮肤的深层损伤，如大面积烧伤、烧伤疤痕、网状疤痕、文身、痣、刃厚皮片(又称薄层皮片，译者注)供区，以及皮肤病，病例总数超过 400 例。

从这些移植实验中，我们发现移植培养上皮是治疗大面积烧伤和皮肤畸形的有效方法。在本章中，我们将介绍自体培养上皮移植的方法和治疗效果。

2　材料和方法

2.1　患者

在过去的 15 年中，我们采用自体培养上皮移植治疗了 276 例患者，采用异体培养上皮移植治疗了 126 例患者。在 276 例自体移植中，34 例用于治疗新鲜烧伤，114 例治疗烧伤疤痕，12 例治疗网状疤痕，28 例治疗文身，6 例用于治疗传统皮肤移植后造成的颜色不均，13 例治疗植皮供区创伤。我们还采用移植的方法治疗了 69 例不同的皮肤病。

186

2.2　人类表皮细胞培养

供体皮片取自患者的健康皮肤。自每个患者身上取一小块皮肤(3cm×1cm)。表皮细胞按照 Green 等描述的方法进行培养[2,3]。细胞接种于 100mm 培养皿(60cm^2 的表面积)(Falcon)或培养瓶(600cm^2 的表面积)(Nunc)。培养容器中有致死量放射线照射过的 3T3 J2 饲养层细胞生长。培养 2~3 周后，表皮细胞将会长满并形成复层上皮。这时，上皮可以用 300U/mL 的分散酶分离(Godo shusei)。

2.3　外科手术

伤口经无柄植皮刀或电动锯齿状砂轮打磨。出血被完全控制后，用新鲜的自体培养移植物覆盖伤口。移植物需要用水性凝胶敷料(Geliperm; Geistlich-Pharma，Switzerland)、浸有生理盐水的纱布和干纱布覆盖 1~2 周。移植位点完全愈合后，用硅凝胶膜(Cica-Care;

Smith & Nephew, Hull, England)作为压力敷料，继续覆盖几个月以防止形成肥厚型疤痕。定期检查移植位点。

2.4 组织学检查

用 DOPA 染色法和电子显微镜研究移植物中的 DOPA 阳性黑色素细胞。在不同的培养阶段，在培养上皮移植处凿孔取样活检(3mm)。用 H&E、DOPA 以及 Fontana-Masson 染色检查切片。对局限性的皮肤创伤、皮肤深度切割伤以及烧伤疤痕的摩擦损伤进行移植治疗时，尚需采用免疫组化法研究基底膜成分的重建情况(VII 型胶原、层粘连蛋白 5)。

3 结果

3.1 培养的上皮细胞

图 17.1 显示了 $60cm^2$ 和 $600cm^2$ 大小的上皮，厚度约为 7~10 层细胞(图 17.2)。扫描电镜检查显示，基底膜和基底膜上层结构基本正常。除角质细胞，DOPA 染色后，还可以分辨出黑色素细胞(用↓标记，图 17.3)。电镜图片显示黑色素细胞正在形成黑色素颗粒，这些黑色素颗粒将被运送到角质细胞。

187

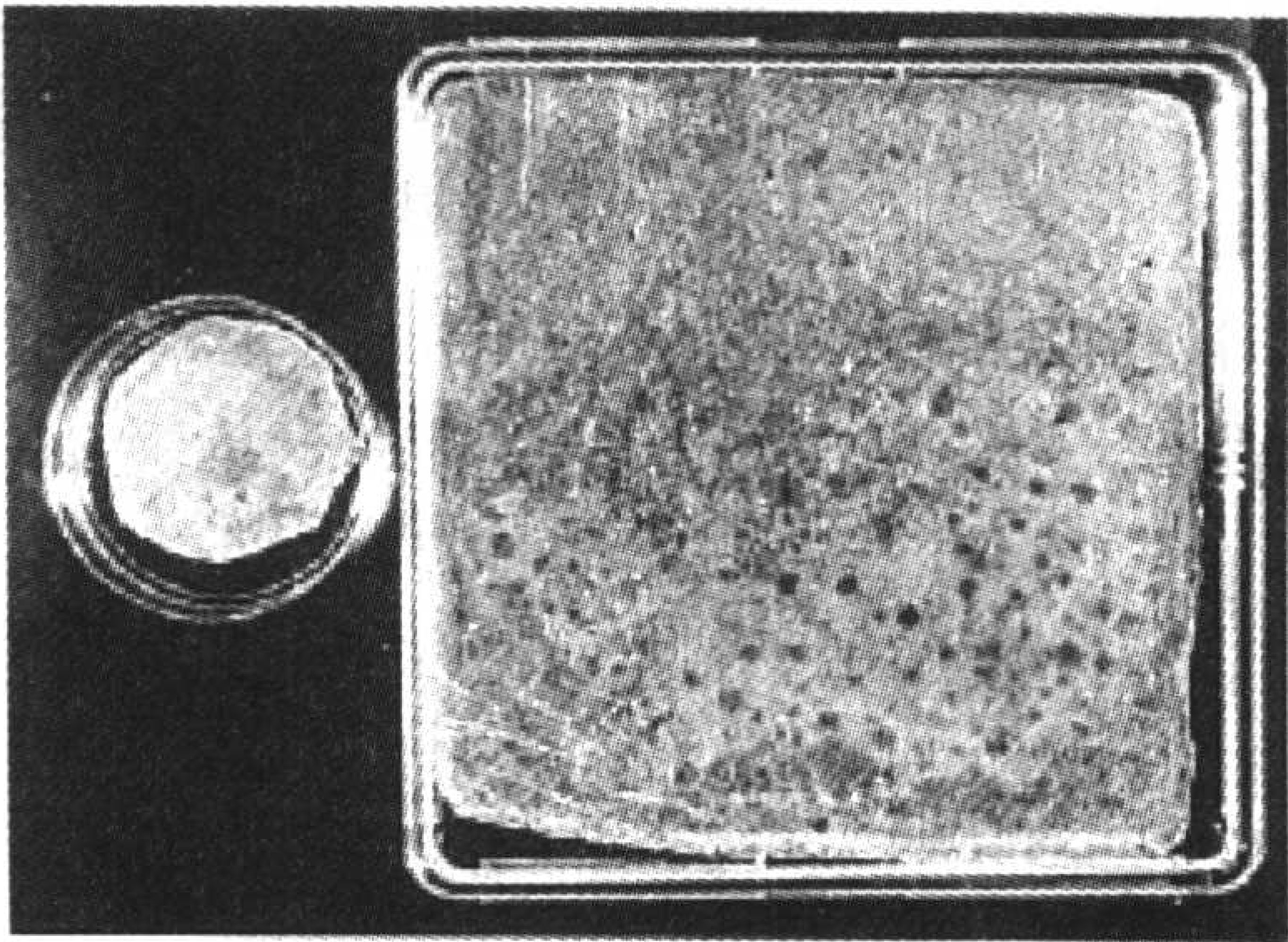


图 17.1 培养的上皮移植物(左，$60cm^2$ 的培养上皮；右，$600cm^2$ 的培养上皮)

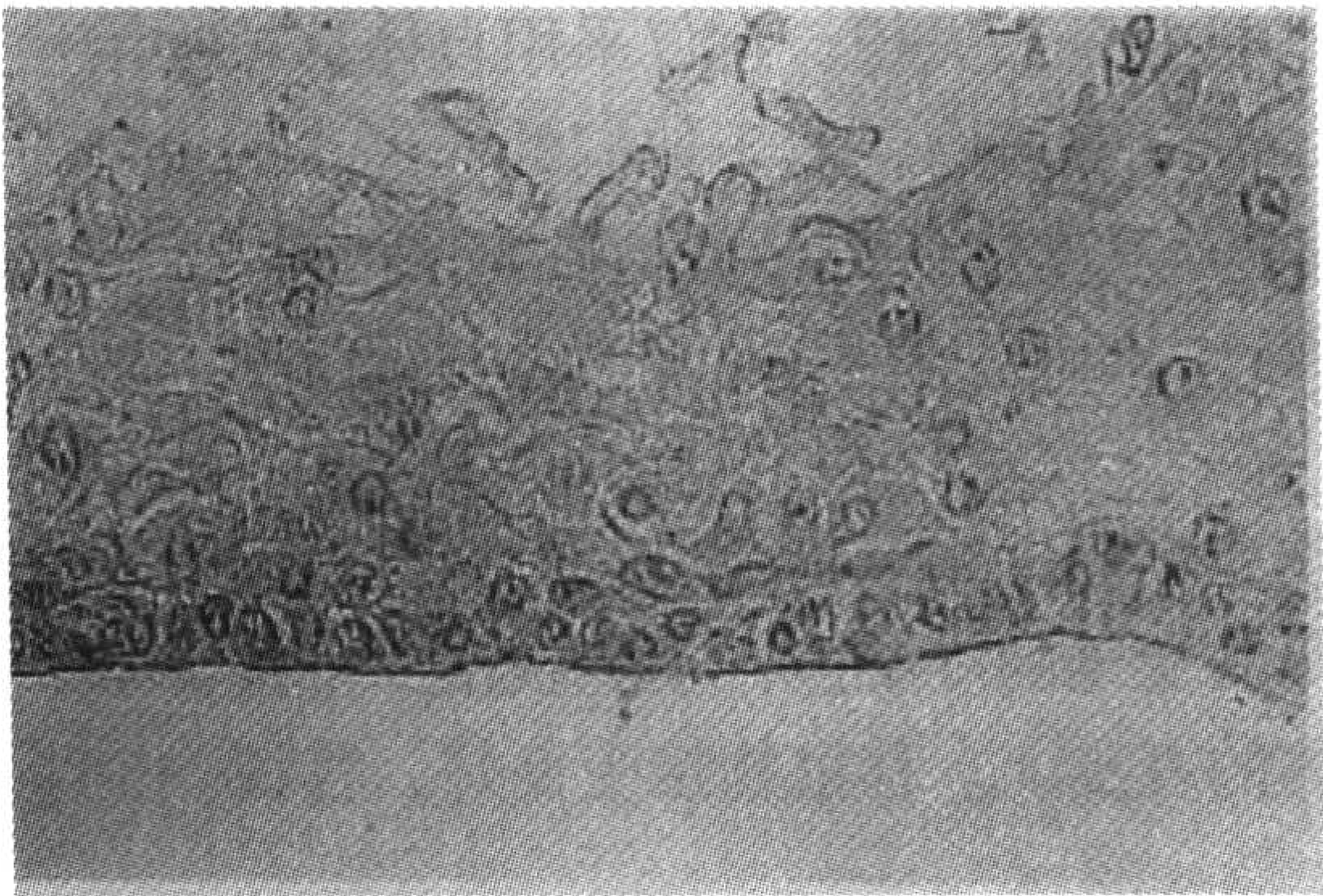


图 17.2 培养移植物的横断结构

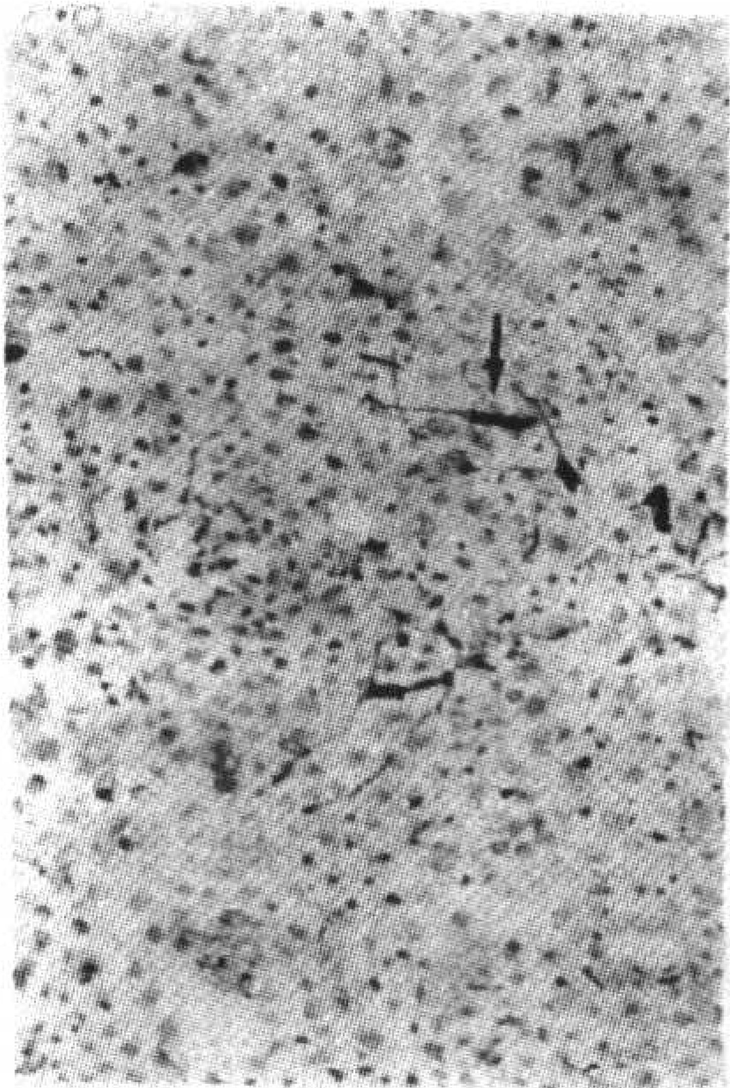


图 17.3 在培养皿上，DOPA 阳性黑色素细胞(↓示)与表皮细胞共同生长

3.2 移植物的接受

培养移植物被受体接受并发生分化是一个受到很多因素影响的过程。将培养移植物用于 STS 供区治疗，创伤可以在 5d 内愈合。此时，表皮网状结构和基底膜已经在移植位点重新形成(图 17.4，左图)。一周后，组织结构几乎完全正常，并且出现了正常皮肤中含有的弹性纤维[4]。这表明创伤位点的残留真皮在培养上皮移植成功中，起到了重要作用。受体位点如果出现脂肪组织和肉芽组织，则不利于移植物的接受。对于需要进行全厚皮切除的病例，如文身，由于局部的所有皮肤组织都被切掉，需要 2~3 周的时间才能观察到表皮厚度正常化。同时，基底膜中发现了扁平纤粘连蛋白 5 的形成(图 17.4，右图)。与有真皮成分存在的浅层磨损疤痕相比，基底膜的正常化进程发生在一个月之后。

188

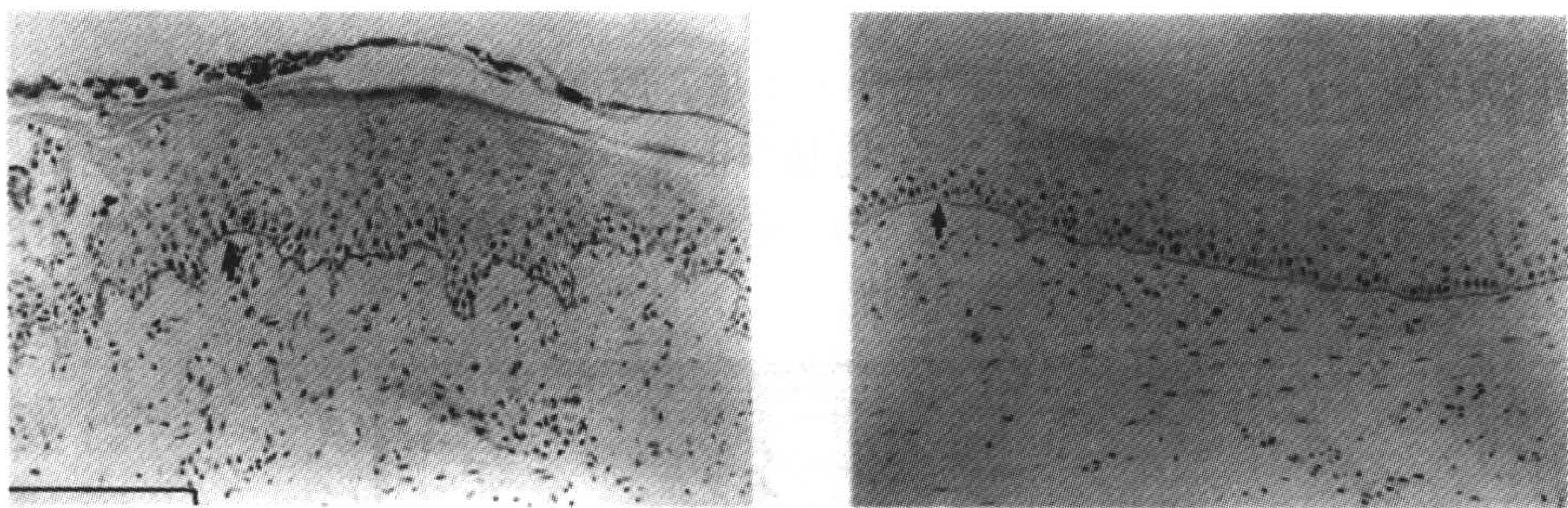


图 17.4 自体培养上皮移植治疗不同创伤时，基底膜的重建情况

左：植片供区移植治疗 1 周后，免疫组化染色显示 VII 型胶原(↑示)；右：深度外伤性文身移植治疗 2 周后，免疫组化染色显示层粘连蛋白 5(↑示)

3.3 手术结果

3.3.1 用自体培养上皮移植治疗新鲜烧伤

对于大面积烧伤而言，仔细处理创面非常重要，创面要尽可能保持无菌。原因是移植治疗肉芽化或者感染严重的三度烧伤的结果颇令人失望。在仅采用自体移植物治疗的病例中，移植物的平均接受率只有 15%。Cuono 等报道，对于他们的病例，如果创面首先用异体移植处理，再进行自体培养表皮移植，三度烧伤的移植物接受率可以达到 85%。采用同样的方法，在我们这里可以达到 73%。

189

3.3.1.1 病例报告

2 岁男童，体表 95%被开水烫伤。创伤发生后，用生物敷料，例如，羊膜以及冷冻的异体培养上皮，尽快地覆盖了伤口。再用其父母的皮肤进行了网状植皮。接下来，在创面被打磨后，将自体培养上皮移植到异体的真皮上。移植物接受良好，移植一个半月后，几乎所有的伤口都已愈合(图 17.5)。

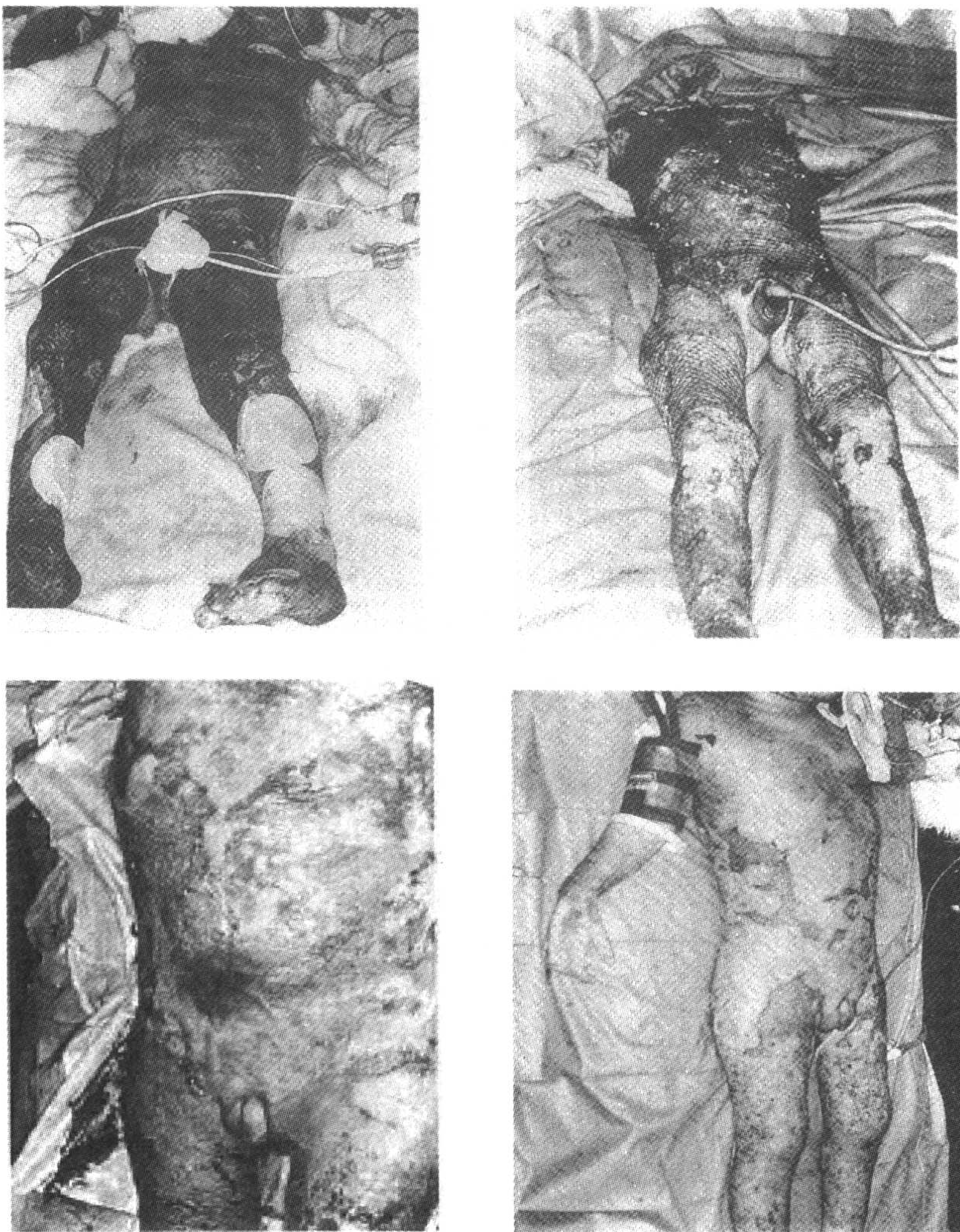


图 17.5 用异体皮肤和自体培养移植物治疗大面积烧伤

上左图：烧伤后第 2 天，创伤用羊膜及异体培养移植物覆盖；上右图：此后创伤被网状异体皮肤覆盖；
下左图：自体培养移植物移植到异体真皮上；下右图：移植后 19 天，几乎所有的创伤都已愈合

3.3.2 烧伤疤痕畸形和移植位点的治疗

为了治疗由于烧伤疤痕，不规则的伤疤，色素沉着不足或过度的伤疤，网状疤痕，或者由于传统皮肤移植造成的皮肤表面畸形，用于表皮培养的皮肤需要从邻近受体的部位采集。将畸形部位进行浅层打磨后，将培养物移植到打磨过的伤口。移植物几乎被完全接受。2 年后，移植部位变得柔，畸形有很大的改善(图 17.6~图 17.8)。皮肤的张力和湿度几近正常。移植部位的柔软度用肤质弹性检测仪进行测定。我们检测了 17 例病例，发现移植位点的弹性能达到正常皮肤的 93%，而未经治疗的伤疤，弹性只有正常皮肤的 53%[6]。表皮的保湿能力通过检测水分吸收与不吸收之间的比例来鉴定。我们对 50 例移植进行了检测(移植后 6~54 个月，平均 18 个月)，结果发现，角质层的水分状态在培养上皮移植治疗后的一年内恢复正常[7]。 191



图 17.6　脸部烧伤疤痕色素沉着过度的治疗

左图：手术前；右图：手术后

192

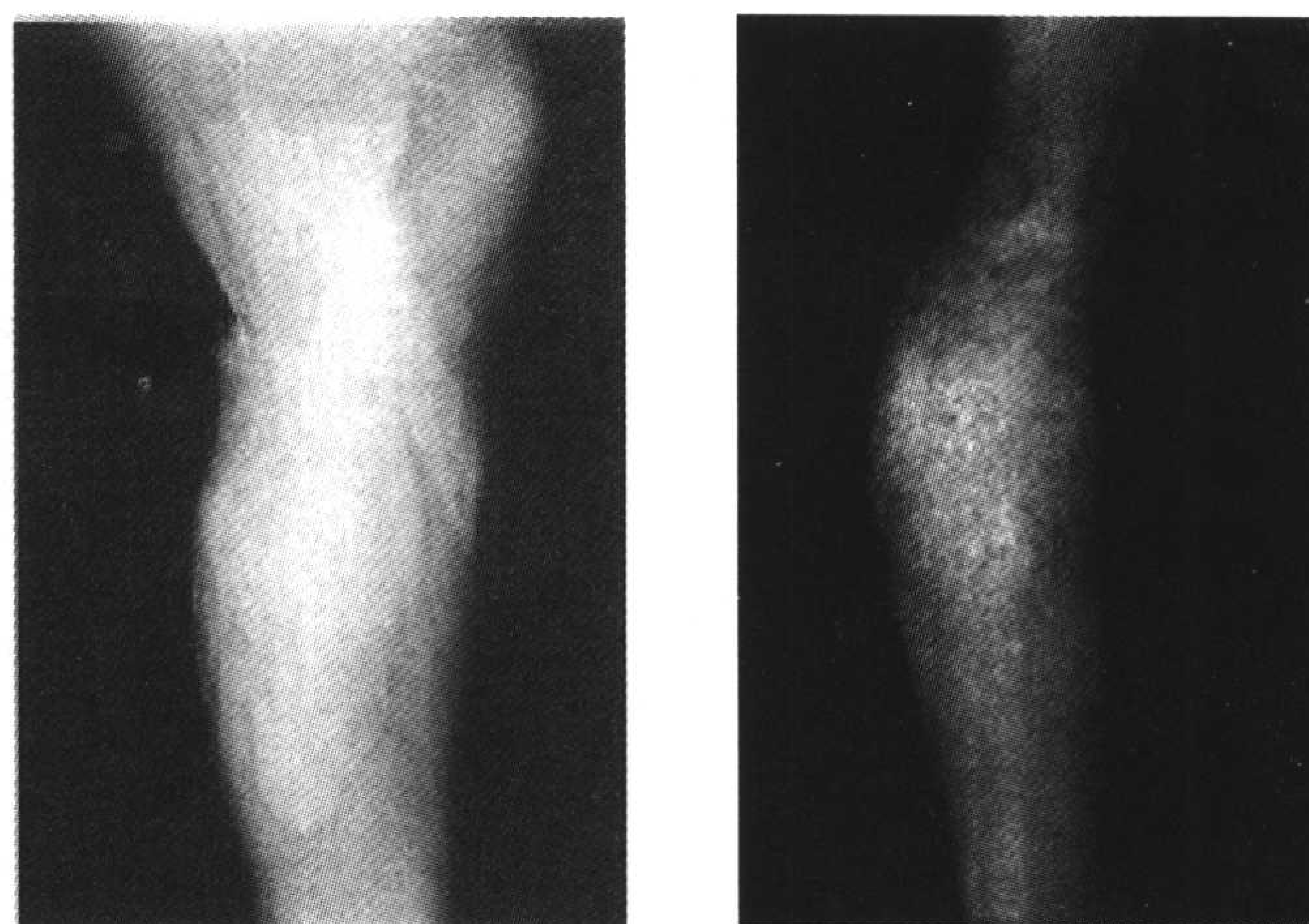


图 17.7　腿部烧伤疤痕色素沉着不足的治疗

左图：手术前；右图：移植 3 年后



图 17.8　网状伤疤的治疗

左图：手术前；右图：移植 3 年后

3.3.3 皮肤病的治疗

我们用自体培养移植物治疗了 69 例不同的皮肤病，例如，黑色素沉着不足病、先天性巨痣、太田痣、ichiocytosis 等。

3.3.3.1 黑色素沉着不足病

紫外线照射结合补骨脂素治疗(PUVA)是皮肤科医生治疗白癜风常用的光学疗法。我们对 20 位患有大面积黑色素脱失，而 PUVA 治疗无效的患者进行了自体培养上皮移植治疗。这 20 个病例包括 18 例白癜风、1 例斑驳病、1 例白化病。供体皮肤取自损害的邻近部位。将黑色素沉着不足的部位用有柄电砂轮进行浅层打磨，然后将培养上皮移植到创伤部位。植皮后，在移植部位涂抹类固醇药膏数月，并建议患者将移植部位暴露在日光下。

193

(1) 移植位点的临床表现。小的伤疤移植位点在移植 1 周后会完全愈合。在最初的几个月内可以观察到移植位点变红。移植后 3 个月，可以清楚地看到发红的部位被散在的或者均匀的黑色素沉积所替代。移植位点还会出现暂时的轻度色素沉积过度，但 6 个月以后就会恢复正常皮肤的颜色(图 17.9，中图)。长时间的随访未发现色素脱失的再发生[8]。

(2) 移植位点的组织学检查。术前的组织检查显示，表皮 DOPA 阳性黑色素细胞和黑色素的完全缺失。移植治疗 12~17d 后，尽管 Fontana-Masson 染色无法显示黑色素，但是免疫组化检测发现在表皮基底层和真皮层内出现少许 DOPA 阳性的黑色素细胞。移植一个半月后，可以在表皮基底层同时观察到 DOPA 阳性的黑色素细胞和黑色素。但与正常皮肤相比，数目仍然较少。在移植后 6~8 月，移植位点在组织结构上接近正常皮肤(图 17.9，左图)。

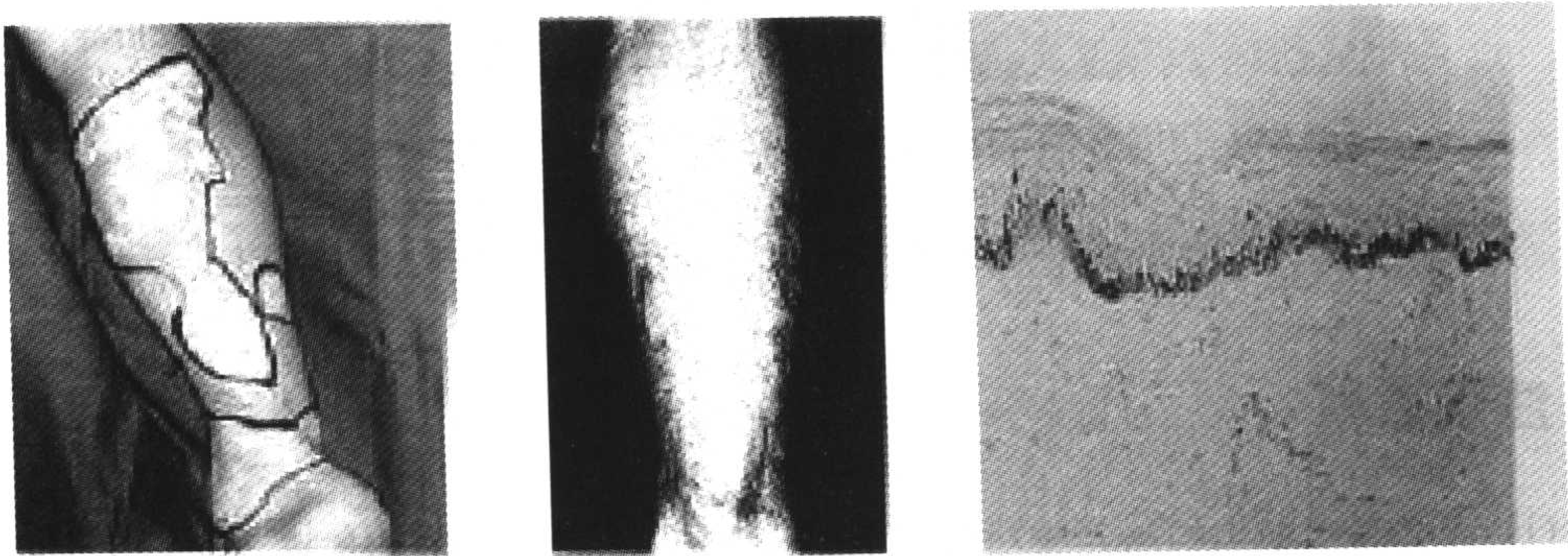


图 17.9 白癜风的治疗

左图：手术前；中图：移植 3 年后；右图：移植 3 年后，移植位点的组织形态(Fontana Masson 染色)

3.3.3.2 先天性巨痣

共对 21 名大面积先天性巨痣的患者采用了自体培养上皮移植治疗。我们采取了自体培养上皮移植结合冻存的异体皮肤移植到躯干及四肢上的巨大创面的治疗方法。首先将病变部位完全切除，将异体皮肤移植到手术创面。10d 后，异体皮肤经浅层打磨后，再将新鲜的自体培养上皮移植到异体真皮上[9]。如图 17.10 所示，移植物的接受良好。

194

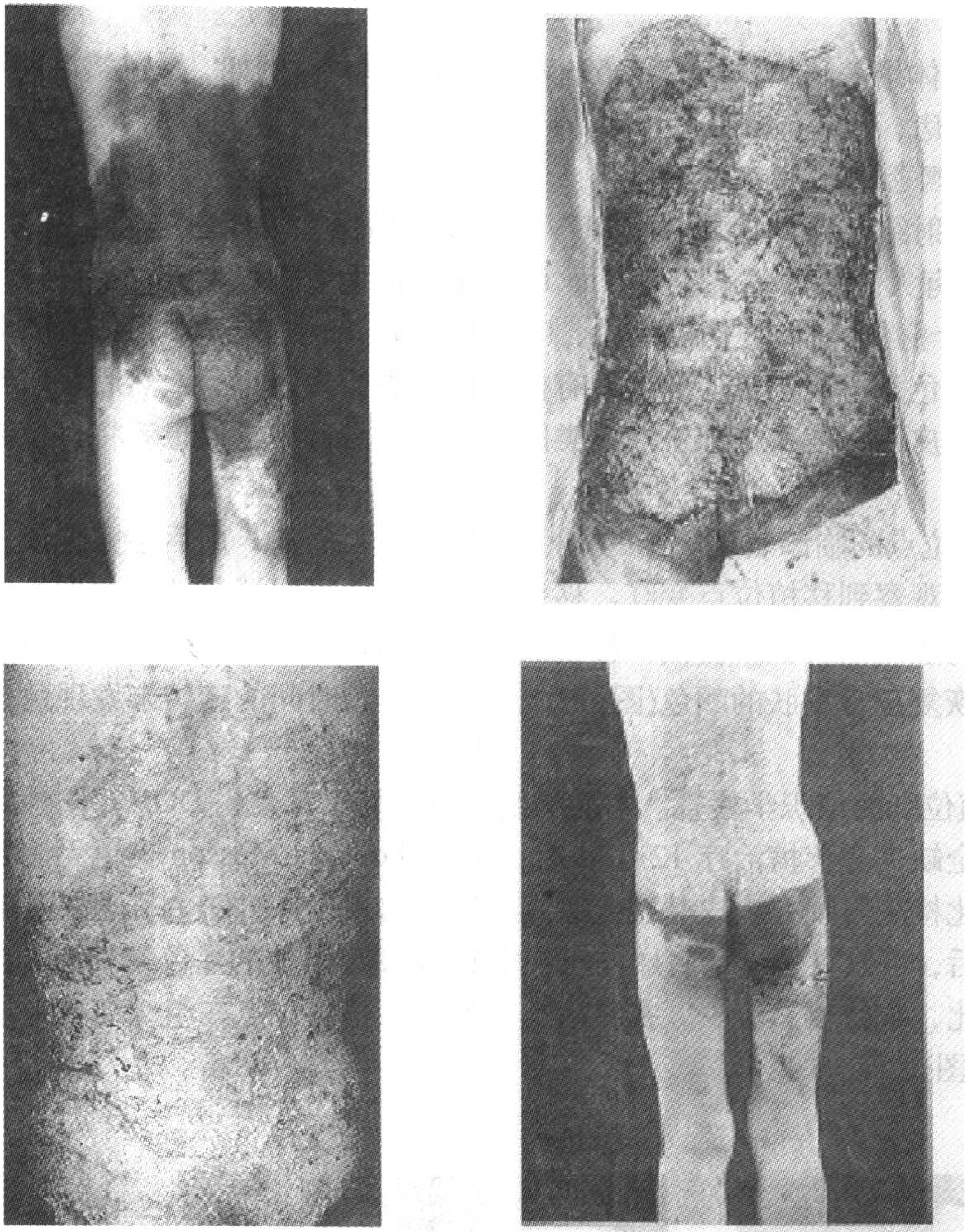


图 17.10 用冻存的异体皮肤和新鲜培养的自体移植物治疗先天性巨痣
上左图：手术前；上右图：切除术后，创面由异体皮肤覆盖；
下左图：自体上皮移植 1 个月后；下右图：自体上皮移植一年后

195

4 注意事项

(1) 人类表皮细胞的培养成功与否主要决定于 3T3 J2 细胞的状态。随着 3T3 J2 细胞传代次数的升高，表皮细胞在饲养层上的生长速度会下降。因此，需要选择传代次数较低的 3T3 细胞作为饲细胞。

(2) 虽然基底膜的形成和表皮分化的成功与否是不是依赖于创面状态，还是个未知数，但是已知有多种因素可以影响到移植物的接受。首先，培养移植物的质量是非常重要的。其次，创面的状况与质量也很重要，如是否有感染。最后，是否需要真皮成分也很重要。以上这些因素对于决定培养移植物是否能够存活非常重要。正如本章所述，Cuono 的方法用于治疗大面积的三度烧伤是非常可靠的。原因在于严重烧伤的患者，其

身体对异体皮肤的免疫排斥反应被抑制。但是，患有先天性巨痣的患者具有正常的免疫功能。虽然冻存后的异体皮肤的免疫原性有所降低，当用它暂时覆盖巨痣患者的伤口并固定培养移植物后，我们发现移植物的平均接受率并不像在烧伤中那么理想。因此，研究如何降低对异体皮肤的免疫反应在治疗全厚皮损伤中非常重要。

(3) 皮肤表面畸形的治疗。我们发现除了治疗烧伤以外，以下一些情况也可以采用培养上皮移植治疗：皮肤表面的畸形、色素沉积过度、脱失或色素沉积不足、不规则疤痕、网状疤痕，以及传统皮肤移植造成的肤色不均。这些畸形采用传统的皮肤移植很难治疗，但是自体移植的办法却可以将其治愈。在治疗烧伤疤痕畸形的过程中，为了获得最佳的肤色及肌理匹配，选取最合适的培养物供体皮肤是个问题。我们共调查了患有皮肤表面畸形接受了初次移植治疗 2 年的 38 位患者。用于移植的培养细胞分别来自臀部、脚底部以及临近移植部位的正常皮肤。结果发现，使用临近移植部位的皮肤获得的治疗效果最为理想。这表明培养上皮具有位点特异性。

(4) 黑色素细胞的重要性。培养的上皮在表皮基底层有 DOPA 阳性的黑色素细胞分布。黑色素细胞在移植物中呈散状，不均一分布。培养上皮移植后复色不完整的部分原因在于移植物的接受，但主要还是取决于移植物本身。如果将回缩的含黑色素细胞的培养物移植到相应的区域，移植部位的形态良好并且复色完全。

(周家喜 译　张　键　王　莉 校)

参 考 文 献

[1] O'Connor, N. E., Mulliken, J. B., Banks-Schlegel, S., et al. (1981) Grafting of burns with cultured epithelium cells. *Lancet* **1**,75-81.

[2] Rheinwald, J. G. and Green, H. (1975) Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* **6**, 331-344.

[3] Kumagai, N., Fukushi, S., Matsuzaki, K., et al. (1995) Treatment of nevus of Ota with autologous-cultured epithelium grafting. *Ann. Plast. Surg*. **34**, 180-186.

[4] Kumagai, N., Nishina, H., Tanabe, H., et al. (1988) Clinical application of autologous cultured epithelia for the treatment of burn wounds and burn scars. *Plast. Reconstr. Surg*. **82**,99-108.

[5] Cuono, C. B., Langdon, R., and McGuire, J. (1986) Use of cultured epidermal autografts and dermal allografts as skin replacement after burn injury .*Lancet* **1**, 1123-1124.

[6] Matsuzaki, K., Kumagai, N., Fukushi, S., et al.(1995) Cultured epithelial autografting on meshed skin grafts scars: evaluation of skin elasticity. *J. Burn Care Rehabil*. **16**, 496-502.

[7] Oshima, H., Kumagai, N, Matsuzaki, K., et al. (1996) The state of hydration in the stratum corneum after a cultured epithelium graft: a clinical study. *Jap. J. Plast. Reconstr. Surg*. **39**, 47-55.

[8] Kumagai, N. and Uchikoshi, T. (1997) Treatment of extensive hypomelanosis with autologous cultured epithelium. *Ann. Plast. Surg*. **39**, 68-73.

[9] Kumagai, N., Oshima, H., Tanabe, M., et al. (1997) Treatment of giant congenital nevi with cryopreserved allogeneic skin and fresh autologous cultured epithelium.*Ann. Plast. Surg*. **39**,483-488.

196

197

第18章 培养上皮细胞的移植

Minoru Ueda, Yukio Sumi, Yoshitaka Hibino, Ken-Ichiro Hata

1 引言

自1980年以来，培养的人类上皮(自体移植物)已经被成功地用于大面积全厚皮烧伤治疗中的永久覆盖物[1,2]，同时也成功地用于治疗外伤性疤痕、巨痣以及文身[3,4]。异体培养上皮(异体移植物)也被用于深度中厚皮和全厚皮烧伤治疗中的暂时覆盖物[5,6]。但是，对于异体移植物作为永久覆盖物治疗全厚皮病变的数据一直有很大争议。

尽管自体和异体培养上皮移植物对于治疗皮肤缺陷非常有效[见注意事项(1)、(2)]，但是，如果一个医院缺乏培养设备并且没有掌握培养这些活细胞的专门技术，他们就无法运用培养上皮的技术来治疗疾病。为了克服这些困难，名古屋建立了专门生产培养上皮的"生物皮肤库"[7,8]。自1995年1月以来，以制造和提供培养上皮为目的的生物皮肤库已经向1间烧伤病房和1所医科大学所属的4个整形外科及1个口腔外科提供了培养上皮。为了向医院提供标准的、质量可靠的培养上皮，我们总结了关于如何运用这种治疗方案的一些常识性结论。本章介绍了上皮移植物的培养的技术和移植的临床结果。

在我们实验室，皮肤或黏膜的样本大小可以在3周之内至少增加1000倍，这样的移植材料能够用于成功地治疗大面积表皮和黏膜的损伤。我们实验室一直向不同医院的多个整形外科提供培养上皮。因为标本和培养移植物的存活时间足以用于运输，因此医院

198

和实验室间的距离并没有成为限制因素[见注意事项(3)]。此外，冻存移植物也可以解决与运输相关的问题。由于可以利用冻存的培养移植物，这就使得不同的医院能够应用规模化生产制造出的标准质量移植物去治疗那些需要进行多次移植的患者，同时也解决了培养与手术时间表间需要协调的所有问题。我们发现，自体培养移植物的平均接受率为95%，异体培养移植物的平均接受率为50%。

虽然有报道认为肌筋膜是理想的移植物接受面，但是仍要避免对烧伤区域的深度切除，因为尤其对于年轻患者，深度切痂后，移植区域回缩的可能性会增大。移植失败的主要原因是感染和出血。出血在真皮实施移植时不是大问题。如果移植到去痂后的肉芽组织，出血可以通过移植前24~48h准备创面进行控制。但是，感染则较难控制。培养的移植物似乎较传统的薄皮移植更容易发生感染。取自尸体的皮肤能控制感染并为培养物移植提供良好的接受基面[9]，因此是很有效的临时覆盖物。但是由于受到法律的限制，有时候很难自由使用尸体皮肤。此时，需要使用来自皮肤库的冻存异体移植物代替冷冻的尸体皮肤，用于烧伤创面的早期覆盖[10]。

无论是新鲜的还是冻存的异体培养移植物均有多种临床用途。我们有证据表明这些移植物可使深度中厚皮烧伤愈合加快。在3例全厚皮病变中，移植异体培养物后，病变局部都发生表皮再生。但是，对再生皮肤的DNA分析并未发现供体来源的细胞。这表明全厚皮损伤的病变中残留的角质细胞，在培养移植物的强烈刺激下，开始生长并迁移，

实现上皮再生[见注意事项(4)]。因此，在进行培养物移植时，坏死组织不能被切除过深，以便在真皮组织中保留一些残存上皮细胞。

2 材料

(1) 生长培养基：DMEM (Life Technologies)，添加以下成分：10%胎牛血清(FCS) (Life Technologies)，1000U/mL 青霉素 G 盐(Sigma)，1mg/mL 卡那霉素(Sigma)，2.5μg/mL 两性霉素 B (Sigma)。

(2) 10μg/mL 丝裂霉素 C (Sigma)，溶于 DMEM。

(3) 3T3 培养基：添加 5%胎牛血清的 DMEM。

(4) 3T3J2 细胞。

(5) 磷酸盐缓冲液(PBS) (Life Technologies)。

199

(6) 杀菌溶液：PBS 缓冲液，添加以下成分：1000U/mL 青霉素 G 盐(Sigma)，1mg/mL 卡那霉素(Sigma)，2.5μg/mL 两性霉素 B(Sigma)。

(7) 0.25%胰酶，0.02%EDTA (Life Technologies)。

(8) 1000U/mL 分散酶 (GODO Shusei)，溶于 DMEM 培养基。

(9) 400U/mL 分散酶，溶于 DMEM 培养基。

(10) 50μm 尼龙筛。

(11) 上皮细胞培养基：DMEM∶F12=3∶1，添加以下成分：5%胎牛血清，10^{-9}mol/L 霍乱毒素，5μg/mL 氢化可的松，5μg/mL 转铁蛋白，10^{-9}mol/L 三碘甲状腺原氨酸(triiodothyronine)，5μg/mL 胰岛素，100U/mL 青霉素，0.25μg/mL 两性霉素 B，0.1mg/mL 卡那霉素,10ng/mL 表皮生长因子。

(12) 冻存液：DMEM(添加 10%甘油作为冷冻保护剂和 15%胎牛血清)。

(13) 无菌胶原膜 (Meipac,Seika Company Ltd.,Tokyo)。

(14) 4.5mL 冻存管 (Nunc)。

(15) 0.1% 庆大霉素软膏。

(16) 3% 四环素软膏。

(17) QIAamp 试剂盒(Qiagen)。

(18) AmpliFLP PCR 试剂盒 (Perkin Elmer，cat. no. D1S80)。

3 方法

3.1 培养上皮的准备

上皮细胞的培养按前述的方法进行[11](图 18.1)。

3.1.1 上皮细胞的饲养层细胞

(1) 3T3 J2 细胞用丝裂霉素 C，在 37℃下处理 2h。

(2) 用 PBS 清洗细胞以除去丝裂霉素 C。

(3) 细胞以 1×10^{4} 个/cm^2 的密度接种在培养皿上。

(4) 在培养上皮细胞前，在 3T3 培养基中培养 24h。

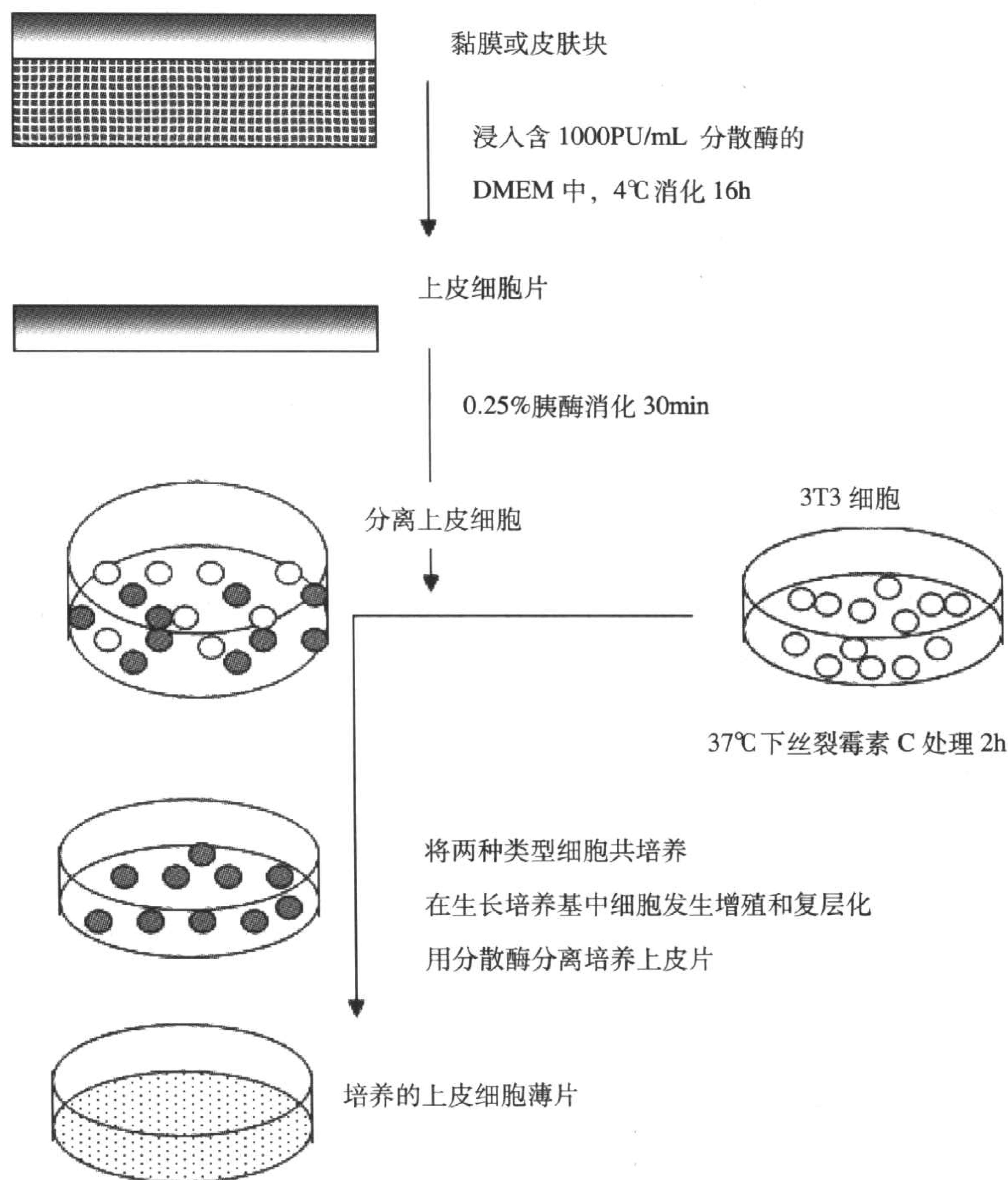


图 18.1　培养黏膜上皮的准备方法

3.1.2 上皮细胞

(1) 外科手术时从患者身上得到的多余组织可以作为口腔黏膜或皮片的来源。

(2) 将组织放入生长培养基。

(3) 清洁黏膜或皮肤，并剪成小块。

(4) 为了除菌，将样品在杀菌溶液中浸泡 2 次，37℃，每次 30min。

(5) 在分散酶溶液中浸泡 2 次，4℃，每次 16h。

(6) 室温下将组织用胰酶-EDTA 混合液处理 30min。

(7) 为了分离不同类型的细胞，加入 3T3 生长培养基，然后搅动 30min。

(8) 用尼龙筛过滤悬液，去掉大的皮片，保留滤液。

(9) 悬浮纯化的表皮和黏膜细胞。

200

(10) 离心 2 次，2500g，5min。

(11) 细胞重新悬浮于 DMEM。

(12) 细胞以 1×10^4 个/cm^2 的密度将上皮细胞接种到 3T3 J2 饲养层细胞上。

(13) 为了得到上皮层，加入上皮细胞培养基并在 5%CO_2、37℃条件下培养。

(14) 每隔 2 天更换一次培养基。

(15) 20d 后培养的上皮层可以用来移植。

(16) 上皮细胞形成克隆的效率决定于细胞长满的速度。上皮细胞接种到饲养层细胞上面(1×10^4 个/10cm 培养皿)。增殖 5d 后统计克隆的数目[见注意事项(5)、(6)]。

3.2 移植物的准备

(1) 一般要在接种培养 20d 以后，当培养上皮长满而且呈现复层化状态时即可以使用。

(2) 用不含血清的 DMEM 清洗。

(3) 在 400U/mL 分散酶溶液中消化 30min，从培养瓶底部分离致密的上皮层。

(4) 将胶原膜放入培养瓶，置于上皮上面。

(5) 除去培养基。

(6) 培养的上皮将会微弱地贴附于胶原膜上。

(7) 小心地将胶原膜和培养上皮同时取出。

201

3.3 冷冻与解冻技术

(1) 冷冻与解冻培养上皮的方式需要按照以下步骤进行[12][见注意事项(7)]。

(2) 使用分散酶 II 从培养瓶中分离并同时取出培养的上皮层和胶原膜[见 3.2 步骤(3)]，放入冻存管中。

(3) 将含有培养上皮的冷冻培养基在 4℃下平衡 30min。

(4) 将冻存管移入–20℃冷冻 1h。

(5) 转至–80℃冰箱过夜。

(6) 在低温冰箱中保存(–145℃)。

(7) 移植手术开始时，37℃水浴冻存管，在 1min 之内使其快速解冻。

(8) 解冻后，将培养上皮层放入无菌平皿，在手术室内用含 10%胎牛血清的 DMEM 清洗。

3.4 患者

(1) 本研究的对象是来自 Aichi 区 5 家不同医院 6 个外科的 103 位患者(表 18.1)。患者本身或亲属均知情同意参与本研究。患者年龄在 1~79 岁。他们的皮肤表面存在 10%~95%的中厚或全厚皮皮肤缺陷。

表 18.1 参与中京生物皮肤库系统的研究所

1. 爱知医科大学　整形重建外科
2. 中京社会保障医院　烧伤护理中心
3. 名古屋大学医学院　整形重建外科
4. 名古屋市立大学医学院　皮肤科
5. 藤田健康大学医学院　整形重建外科
6. 名古屋大学医学院　口腔外科

(2) 对于自体移植的病例，患者入院一周内，经局部麻醉，从每位患者的皮肤或是口腔黏膜取全厚皮样本(1~4cm^2)。

(3) 将样本放入盛有上皮细胞培养基的50mL离心管中，运送至实验室。

202

3.5 培养上皮的移植

(1) 用分散酶II分离培养上皮(见3.3)。

(2) 在无血清培养基中清洗，并将基底面向上置于无菌的胶原膜上(图18.2)。

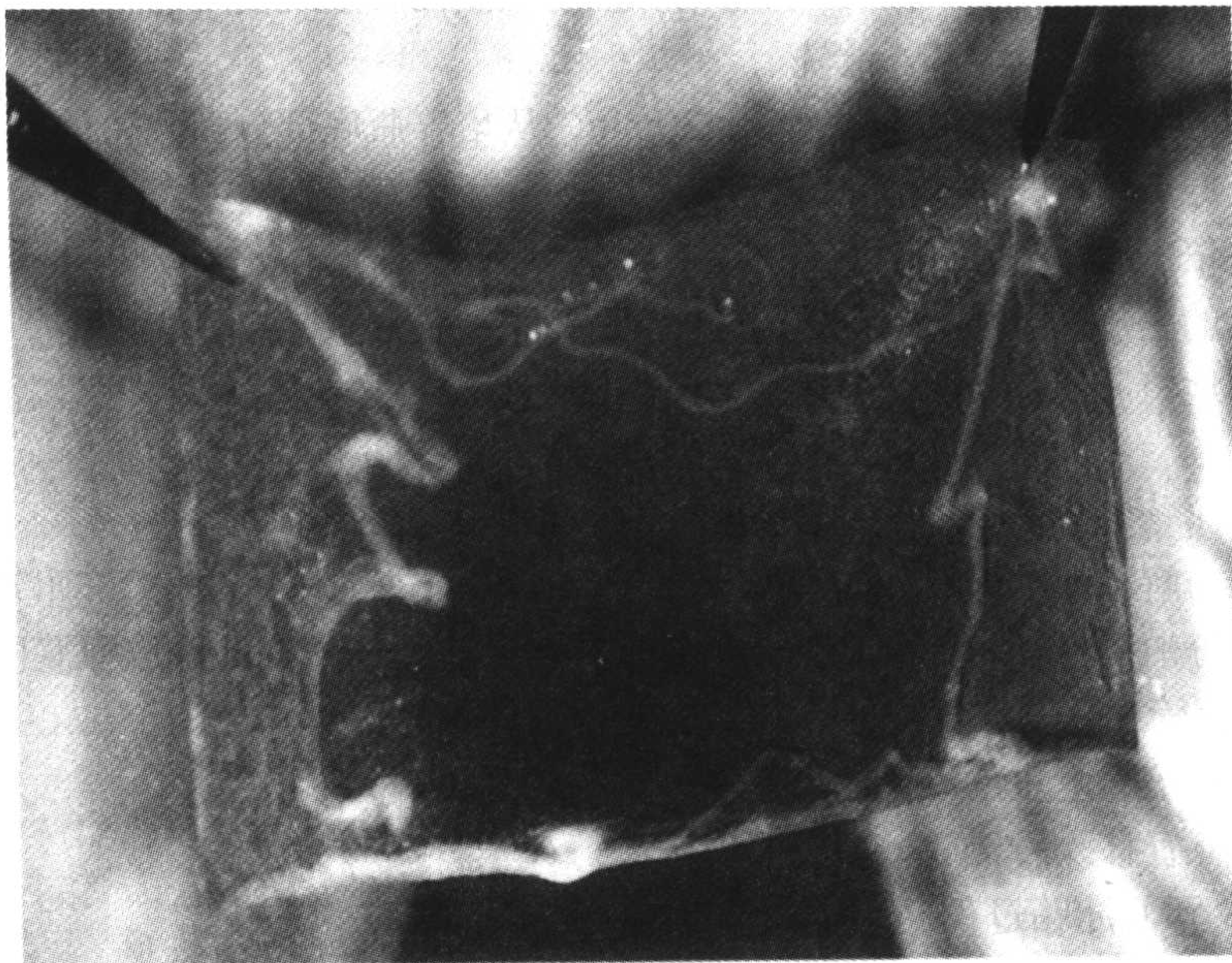


图18.2 以胶原膜作为载体时，培养黏膜上皮的大体外观

(3) 将培养上皮放到盛有无血清DMEM的试管中，运送到医院或手术室。

(4) 将培养移植物置于准备好的位置(皮肤清创术以后)，让基底层直接与创伤面接触。

(5) 让移植物完全覆盖处理过的创面，确定没有缝隙或间隔。

(6) 用多层含庆大霉素和四环素软膏的网眼纱布覆盖移植物。

(7) 每2天更换一次敷料。

(8) 判断移植上皮覆盖面积与创伤面积的比例，如果达到临床意义上移植物被“接受”，就可以去掉纱布。一般是在移植完成后6~14d[见注意事项(8)]。

(9) 由于上皮细胞可以从“被接受”的上皮边缘长出来，要在临出院的时候计算培养上皮覆盖全厚皮病变的比例。

203

(10) 对于异体移植，上皮细胞需来自健康的供体，要对供体进行所有献血前的常规检查(图18.3)。

(11) 对于大多数患者，自体移植物来自他们自身的健康皮肤。通常会从健康的皮肤上取走一块刃厚皮片进行移植。为了保护供皮部位，会用异体培养移植物覆盖供体位点。

(12) 对于一些患者，如果他们的上皮曾经被培养并冷冻，则可以直接使用。

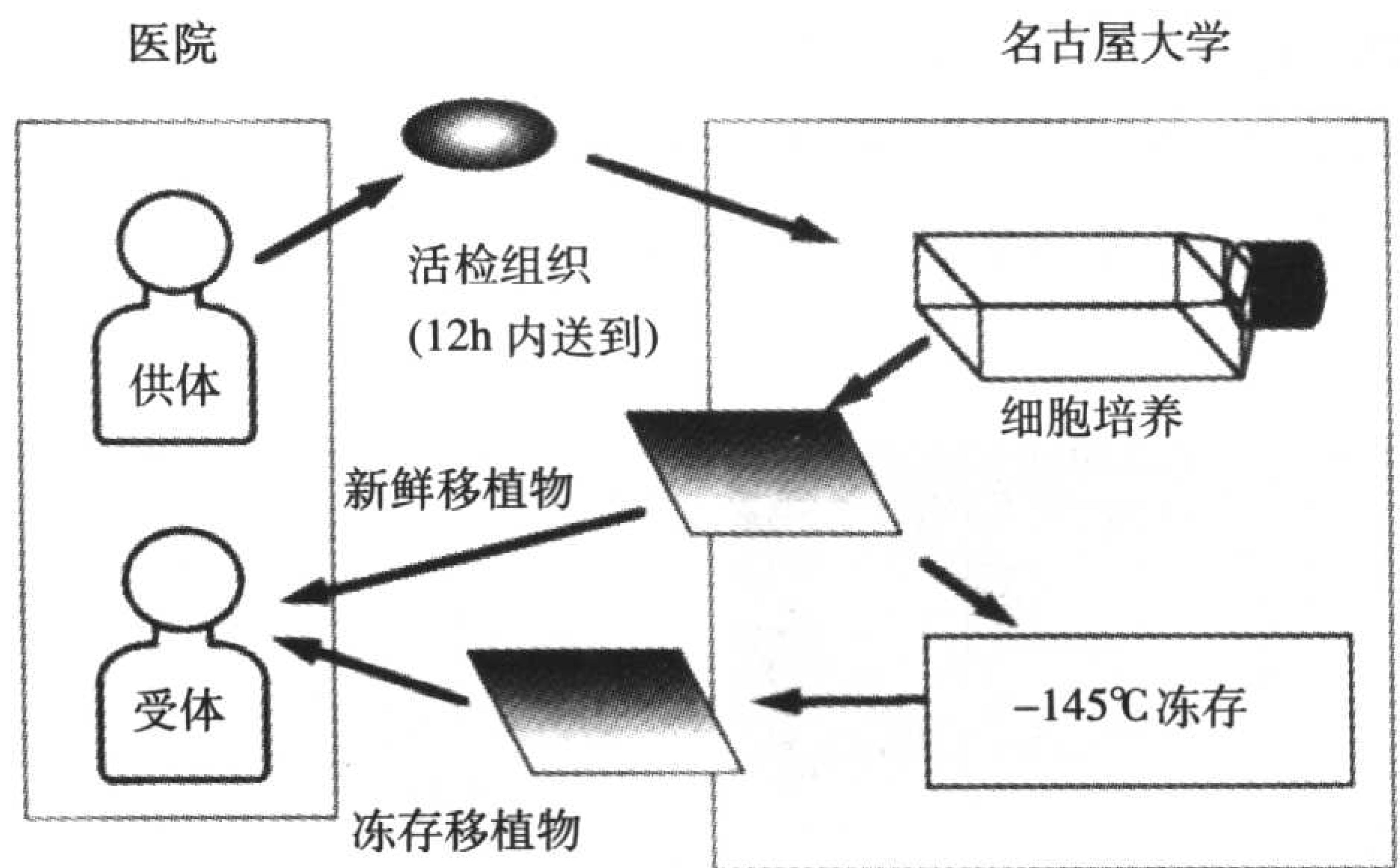


图 18.3　生物皮肤库系统

(13) 冷冻移植物需要保存在−145℃，需要用干冰运送到医院或手术室。

(14) 在手术室，冻存管需要在 37℃水浴中浸泡 10min 后打开。

(15) 将移植物用无菌 PBS 清洗 2 遍，然后放到移植位点。

(16) 为了判断异体细胞的存活时间，或者曾经存活的时间，需要从外周血样本(移植受体)和皮肤活检样本(移植接受位点)中分别提取 DNA[13][见注意事项(9)]。

(17) 用 QIAamp 试剂盒提取 DNA，操作方法按照说明书进行。

(18) 纯化的 DNA(3μg)用 *Hin*f I 酶 37℃消化 2h。

(19) 进行 PCR 检测，操作方法按照 AmpiFLP 试剂盒说明书进行。

4　注意事项

(1) 图 18.4 显示了自体培养物移植治疗 80 位患者的临床结果。患者年龄在 1~79 岁，皮肤创伤区域覆盖身体表面积的 10%~95%。移植应用于中厚皮或全厚皮创伤。将烧伤创面的坏死组织切除，直至暴露肌肉筋膜或新鲜真皮。对于其他患者，受体部位的病变被切除，露出有活力的真皮组织。

204

(2) 异体移植物治疗了 23 个病例(图 18.5)。在大多数接受大面积刃厚网状皮肤移植物治疗的患者中，“新鲜的”或冰冻的异体培养移植物被置于供体位点。术后 2~5d，这些供体位点全部重新上皮化。在一号患者上观察到一个有趣的现象：刃厚皮片的供体位

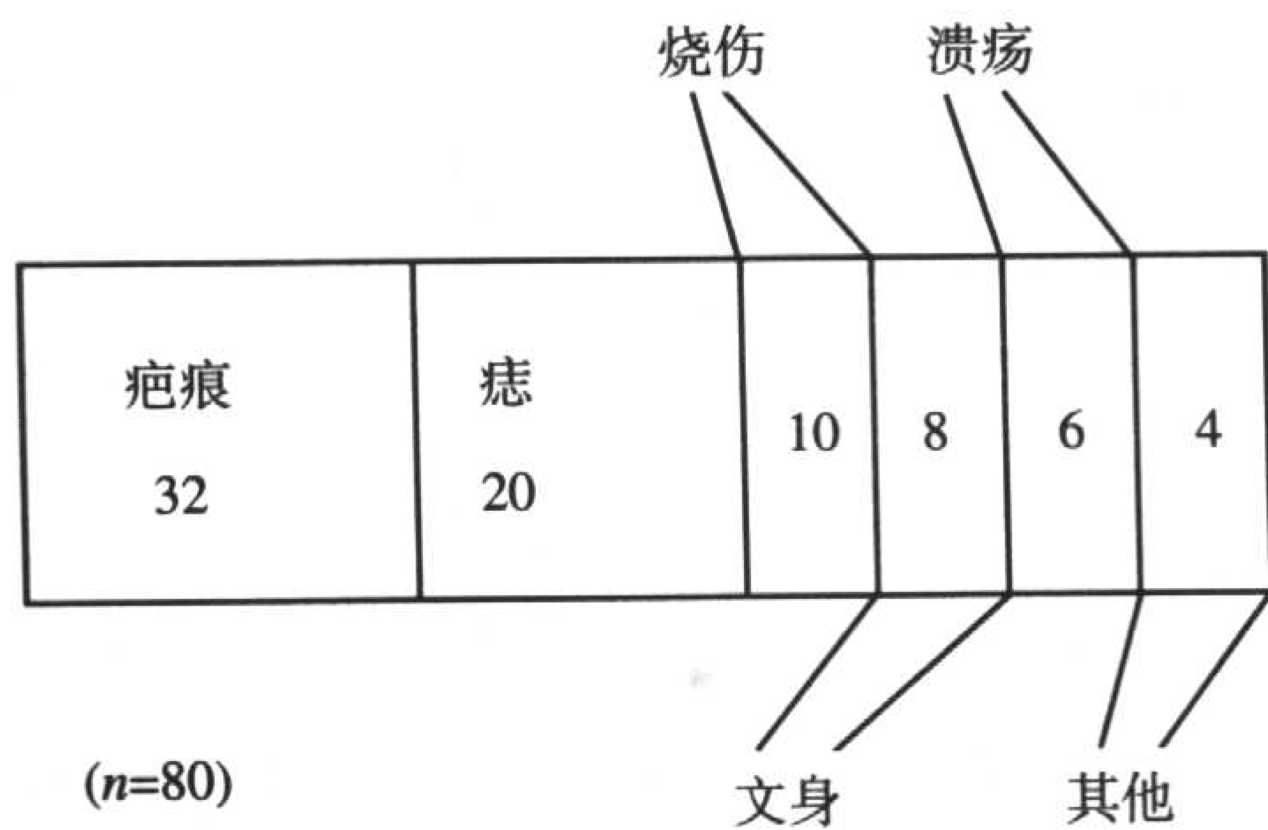


图 18.4　采用自体移植治疗的患者

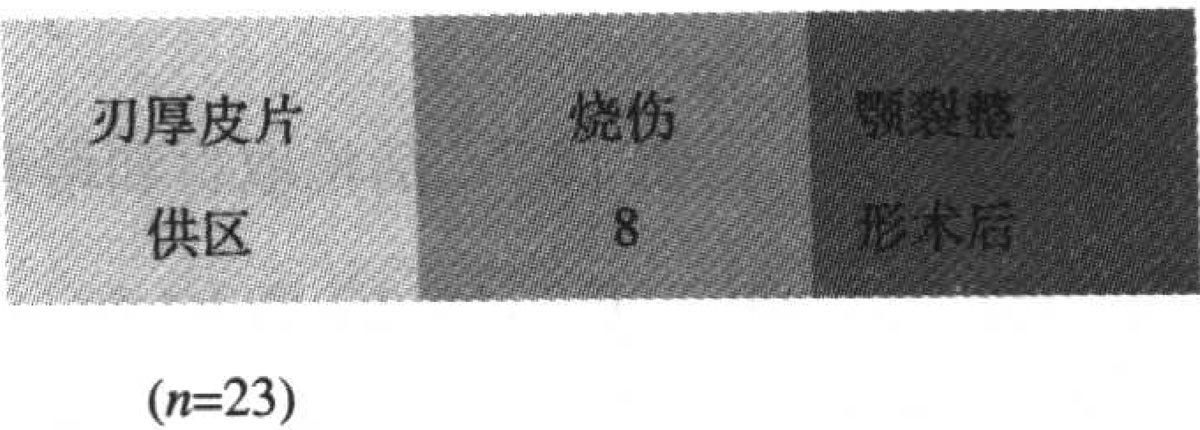


图 18.5　采用异体移植治疗的患者

点由培养的异体移植物部分覆盖；覆盖的部位在 5d 内愈合，而且没有留下疤痕，而未被移植物覆盖的部位愈合较慢，后来形成增生性疤痕(图 18.6)。此外，5 位腭裂患者在常规腭成形术后也采用了异体培养口腔黏膜移植治疗。

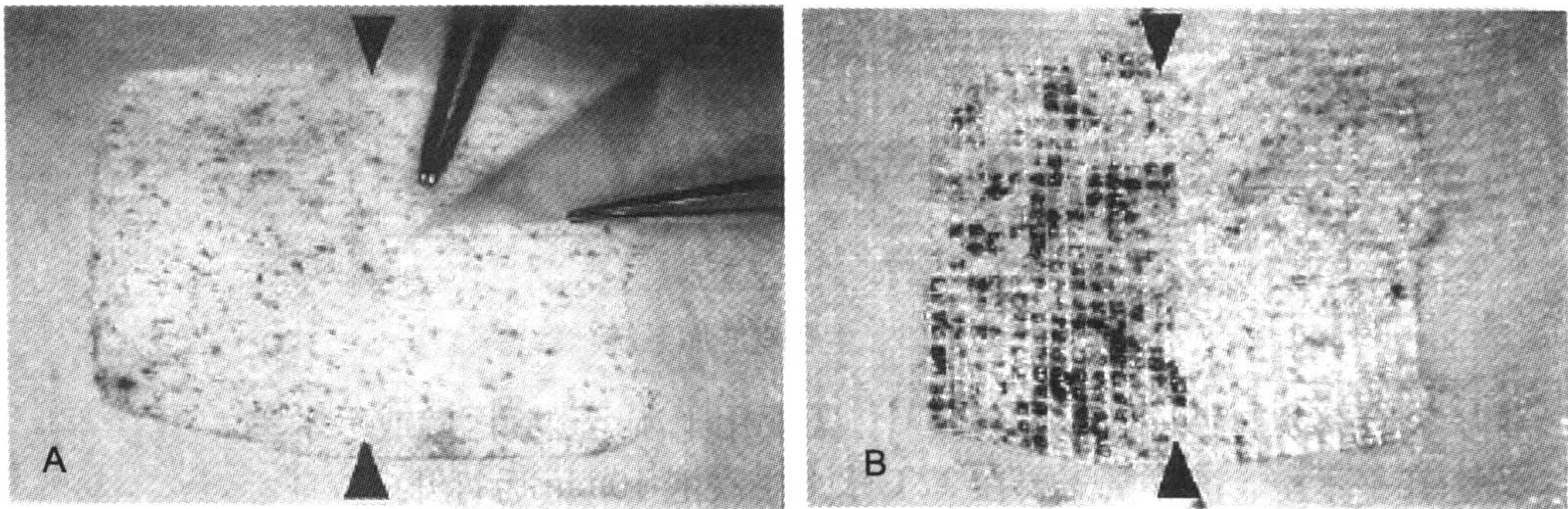


图 18.6 被移植物覆盖和不被覆盖的部位愈合效果对比

(A) 培养的黏膜上皮置于刃厚皮片的供皮位点；(B) 异体移植 3d 后，移植位点上皮化，而对照侧未上皮化，且观察到出血和渗出

(3) 考虑到实验室和一些整形外科之间的距离(20km 以上)，有必要对活组织或上皮的运输时间给出上限。据观察，当皮肤活检组织被置于含 10%胎牛血清的培养基中，并在室温下保存时，可以由分离的上皮细胞获得最高的产量和集落形成效率，而且集落形成效率在接受检测的 12h 之内未发生显著变化(图 18.7)。

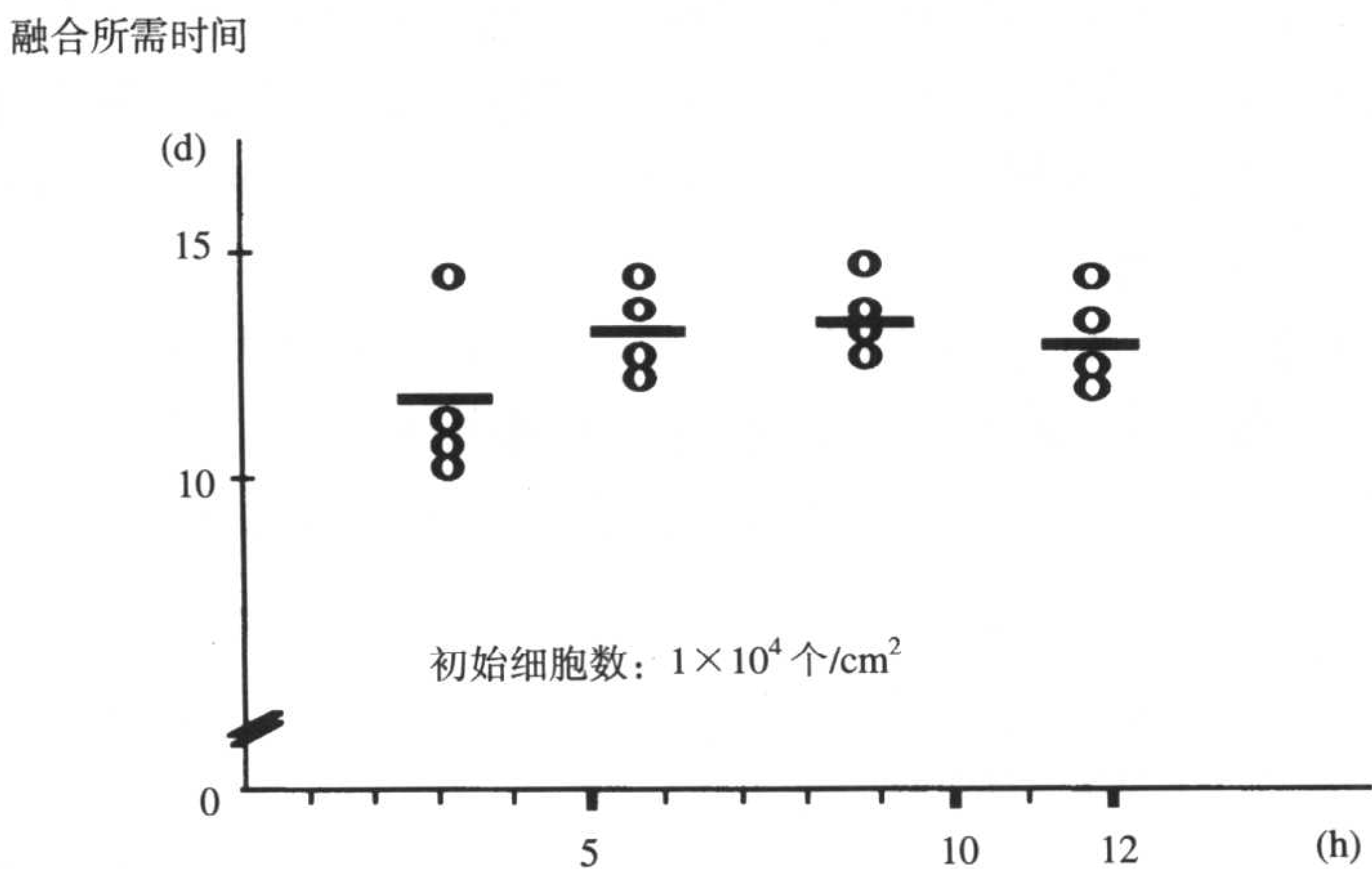


图 18.7 活检取材和培养的间隔时间与集落形成率的关系

(4) 图 18.8 显示了一位 30 岁妇女，左腿烧伤后 3 周的照片。虽然采用了传统的药膏治疗，但是中厚皮创伤仍然存在。将坏死组织用剃刀去掉后，把准备好的培养上皮移植到受体部位。2 周后，移植位点重新上皮化，移植物的存活率达 95%。

205

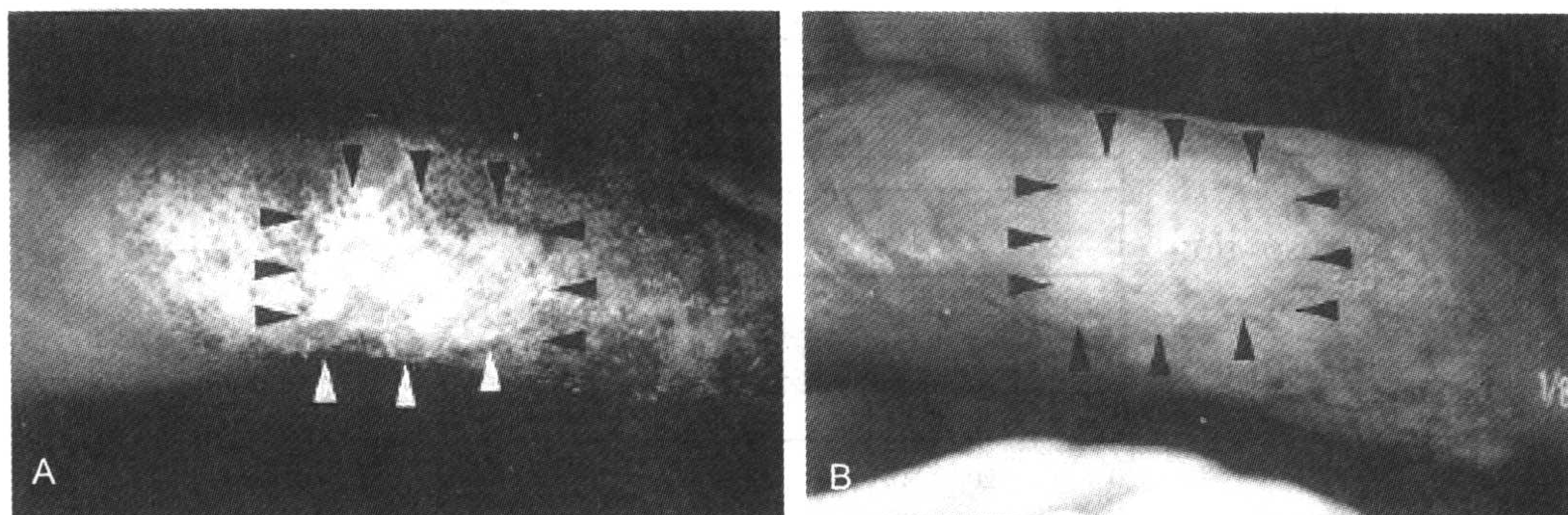


图 18.8　一位 30 岁左腿烧伤(深层真皮烧伤)的女性患者治疗的前 3 周照片

(A)手术前；(B)移植区域 2 周后完全上皮化

(5) 来自黏膜或皮肤的上皮细胞在 3d 内形成集落。口腔上皮细胞的集落形成率为 7%，皮肤角质细胞的集落形成率为 5%(图 18.9)。

206

(6) 在三位接受了化疗和放疗的癌症患者中，我们无法获得长满的次代培养物。这可能是由于基底层角质细胞生长能力下降造成的。

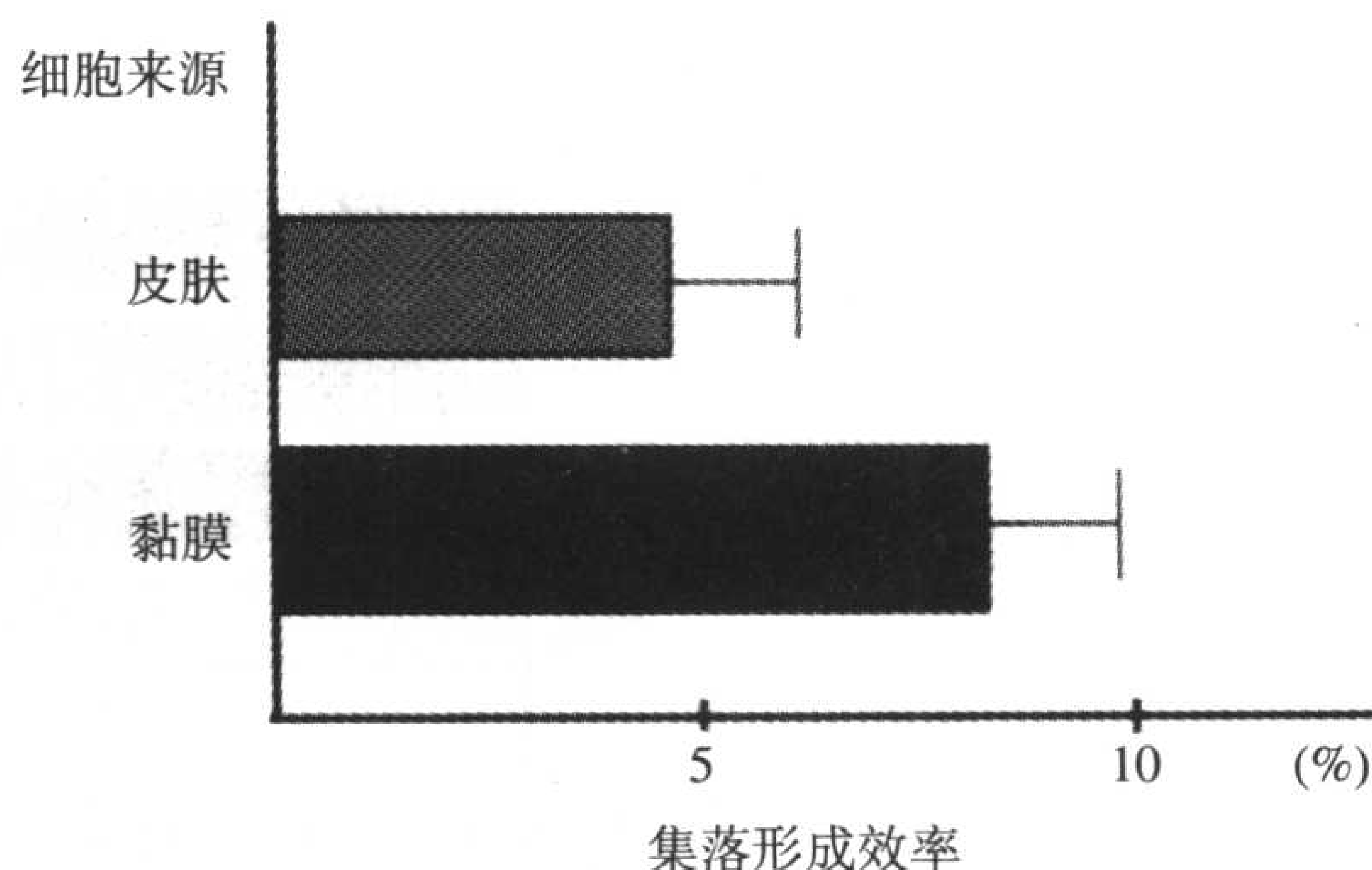


图 18.9　皮肤和黏膜细胞的集落形成率

(7) 冻存移植物的活力可通过对分散上皮细胞的光学显微镜和流式细胞术检查评估。冻存前后移植物横断面的组织结构相似，而且光镜下显示冻存后的上皮仍含有保存完好的上皮细胞。流式细胞仪分析表明，冷冻后细胞活力在任何情况后都在 62%以上。采用同样的冻存保护剂，–145℃条件下保存的培养上皮的细胞活力高于–80℃(图 18.10 和图 18.11)。

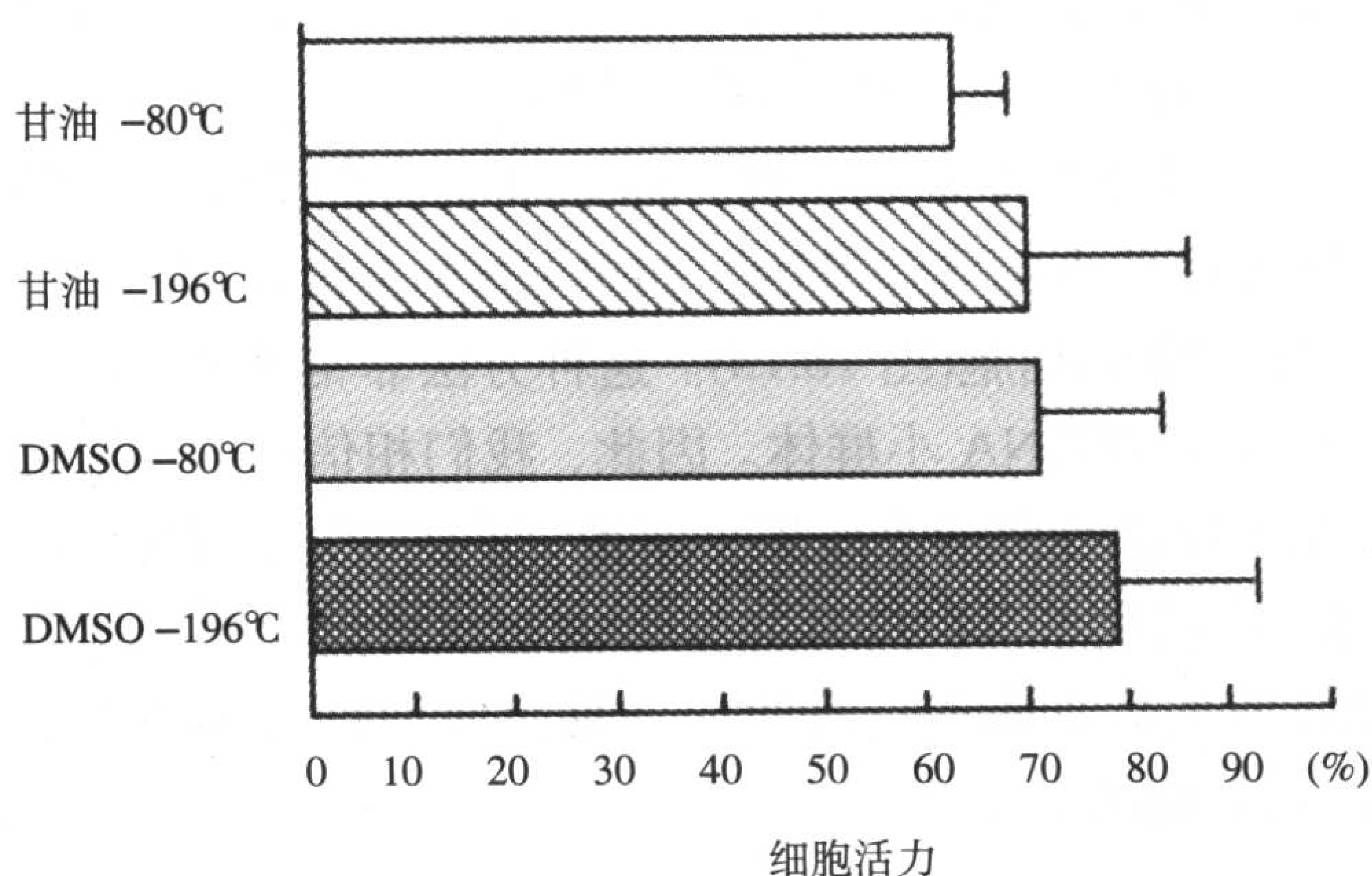


图 18.10　培养上皮冻存 3 周后的细胞活力

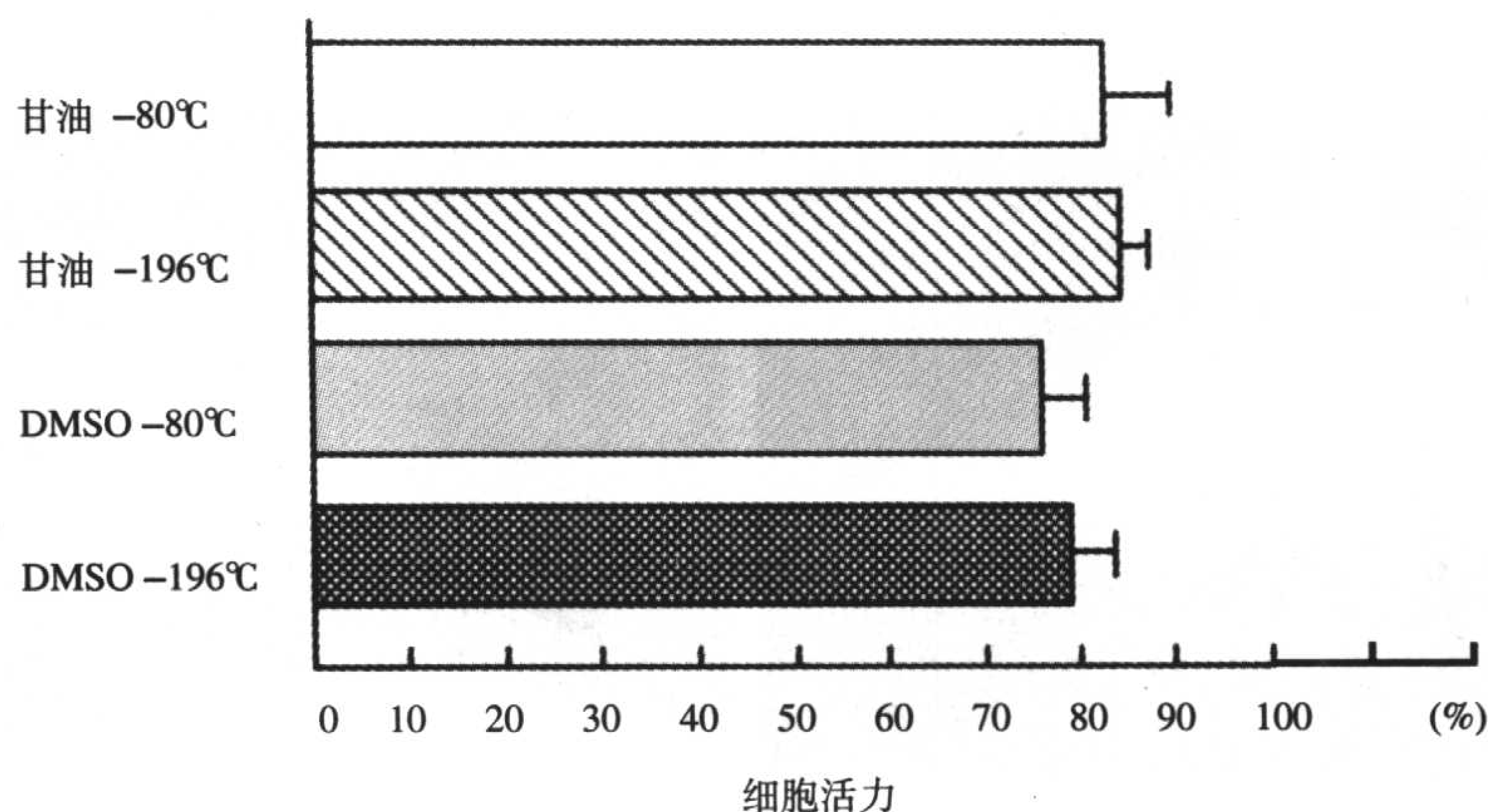


图 18.11　培养的黏膜上皮冻存后 3 周的细胞活力

(8) 在 65 岁以上的患者中，去掉敷料时移植物的平均接纳率为 47%。对于所有其他患者，移植物的平均接受率达到 100%(图 18.12)。

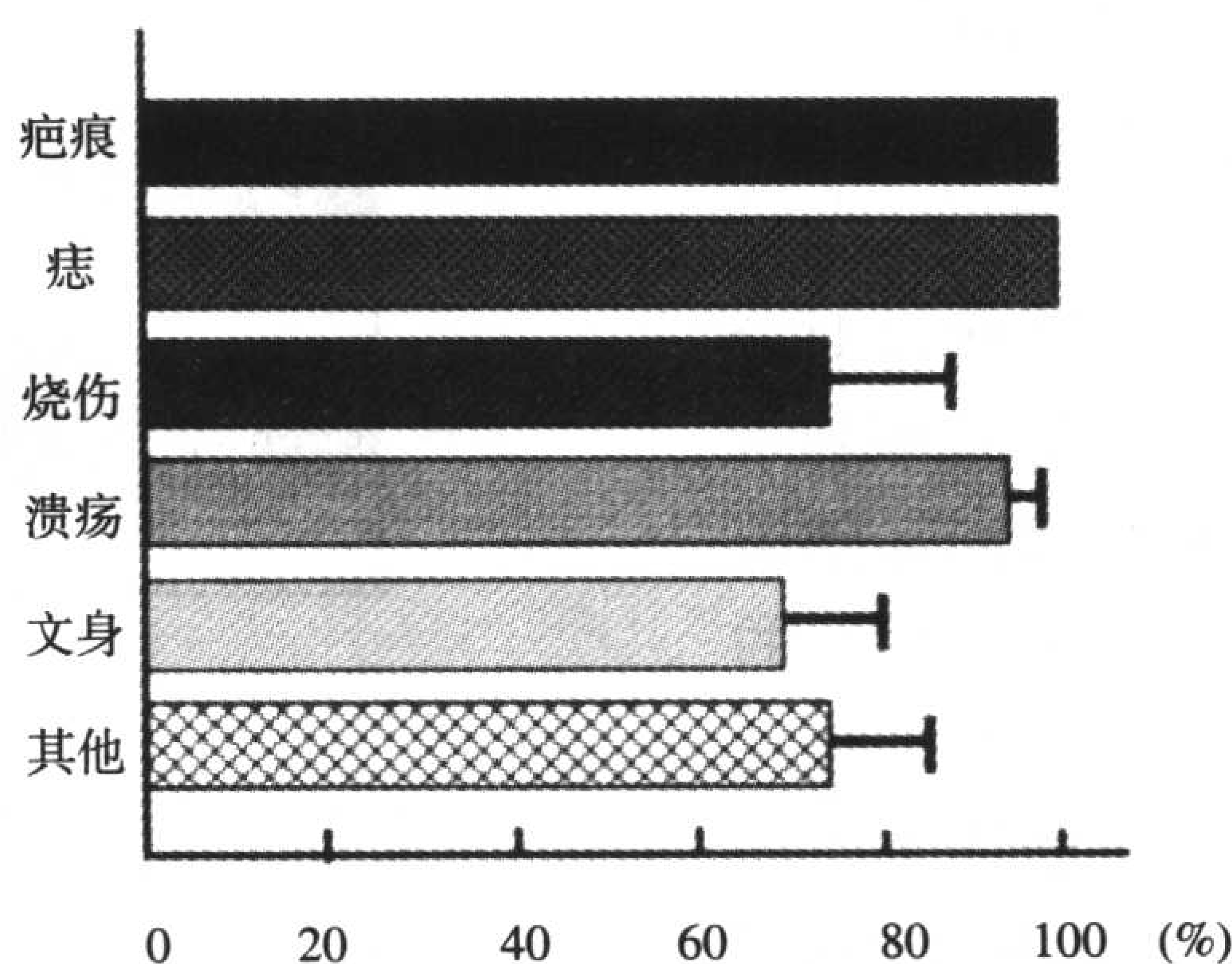


图 18.12　自体移植物的存活率

(9) 为了确定培养异体移植物的存活时间，移植后 1 个月，从异体培养移植物移植后，表皮再生的部位做全厚皮打孔取样。同时采集受体的外周血作为对照。提取 DNA，分析以串联重复方式存在的 DNA 重复序列，称为可变性串联重复序列(VNTR)。我们分析了包含 VNTR 的 D1S80 位点的等位基因。如果 DNA 条带没有差异，说明至少在我们检测的患者中只有自体来源的细胞(图 18.13)。这种方法非常敏感，以致在不同的实验中我们检测到含量在 2%以下的 DNA 小群体。因此，我们相信培养的异体移植物无法存活很久，它们的作用仅在于促进残留的表皮细胞增殖。对于一位手臂烧伤的 50 岁男性患者，虽然没有采取清创术，在接受了 3 次冻存异体移植物移植治疗后，最终溃疡完全愈合(图 18.14)。我们建议烧伤发生后立即进行冻存异体移植物治疗能够获得最好结果，移植物会刺激残留角质细胞和创面的上皮化。

207

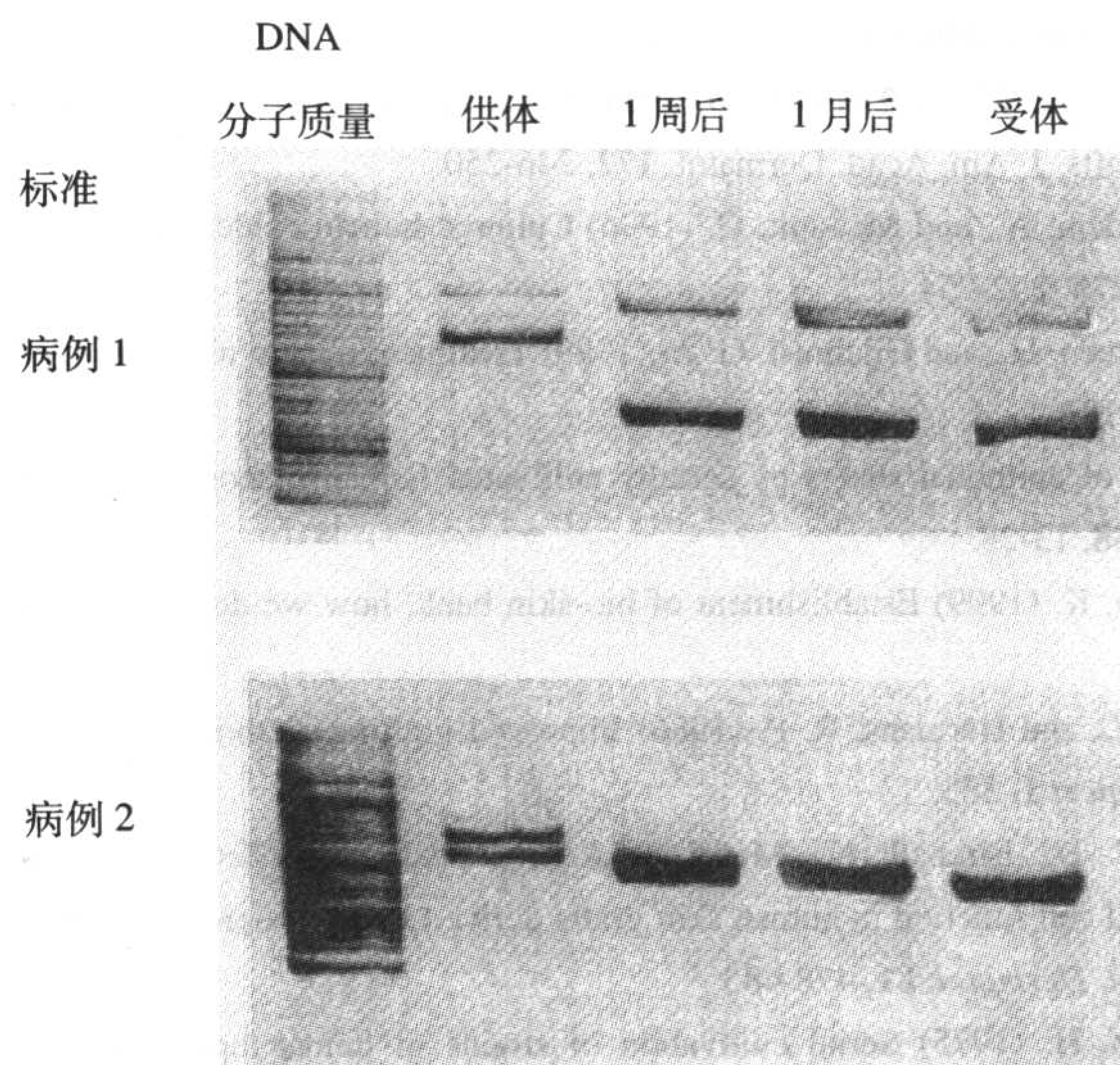


图 18.13　两位患者的 VNTR 分析

二者 DNA 条带未见差异，提示仅自体细胞存活下来

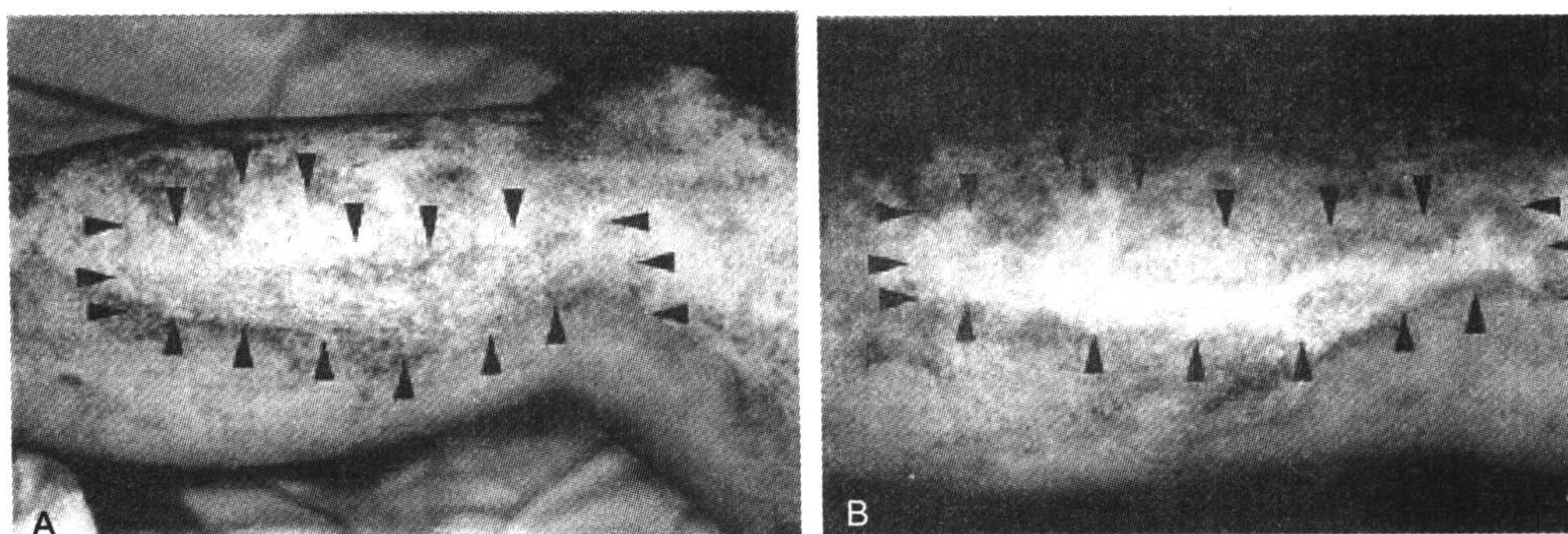


图 18.14　一位 50 岁臂部烧伤的男性患者

(A)手术前；(B)移植区域出现光滑皮肤，溃疡完全愈合

208

致谢

本研究由日本 Organization for Drug ADR Relief，R&D Promotion and Product Review 的 Promotion of Fundamental Studies in Health Sciences 项目支持。

(周家喜 译　张　键　王　莉 校)

参 考 文 献

[1] O'Connor, N. E., Mulliken, J. B., Banks-Schlegel, S., Kehinde, O., and Green, H., (1981) Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells. *Lancet* **1**, 75-78.

[2] Gallico, G. G., O'Connor, N. E., Compton, C. C., Kehinde, O., and Green, H. (1981) Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *N. Engl. J. Med.* **311**, 448-451.

[3] Gallico, G. G., O'Connor, N. E., Compton, C. C., Remensnyder, J. P., Kehinde, O., and Green, H. (1989) Cultured epithelial

209

autografts for giant congenital naevi. *Plast. Reconstr. Surg*. **84**, 1-9.

[4] Carter, D. M., Lin, A. N., Varghese, M. C., Caldwell, D., Pratt, L. A., Eisinger, M. (1987) Treatment of junctional epidermolysis bullosa with epidermal autografts. J. Am. Acad. Dermatol. **172**, 246-250.

[5] Thivolet, J., Faure, M., Demidem, A., and Mauduit, G. (1996) Cultured human epidermal allografts are not rejected for a long period. *Arch. Dermatol. Res*. **278**, 252-254.

[6] Phillips, T. J., Kehinde, O., Green, H., and Gilchrest, G. A. (1989) Treatment of skin ulcers with cultured epidermal allografts. J. *Am. Acad. Dermatol*. **21**, 191-199.

[7] Ueda, M. (1995) Formation of epithelial sheets by serially cultivated human mucosal cells and their applications as a graft material. *Nagoya J Med. Sci*. **58**, 13-28.

[8] Ueda, M., Sumi, Y., and Hata, K. (1999) Establishment of bio-skin bank: how we do it in our hospitals. *Ann. Plast. Surg*. **42**, 574-576.

[9] Teepe, R. G. C., Ponec, R. W., and Hermans, R. P. (1986) Improved grafting method for treatment of burns with autologous cultured human epithelium. *Lancet* **1**, 385.

[10] Langdon, R. C., Cuono, C. B., Birchall, N., Madri, J. A., Kuklinska, E., McGuire, I., and Moellman, G. E. (1988) Reconstruction of structure and cell function in human skin grafts derived from cryopreserved allogeneic dermis and autologous cultured keratinocytes. J. *Invest. Dermatol*. **81**, 478-485.

[11] Rheinwald, J. G. and Green, H. (1975) Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cell. *Cell* **6**, 331-344.

[12] Hibino, Y., Hata, K., Horie, K., Torii, S., and Ueda, M. (1996) Structural changes and cell viability of cultured epithelium after freezing storage. J. *Craniomaxillofac. Surg*. **4**, 346-351.

[13] Burt, A. M., Pallett, C. D., Sloane, J. P., et al. (1989) Survival of cultured allografts in patients with burns assessed with probe specific for Y chromosome. *BMJ* **298**, 915-917.

第 19 章 正常人类上皮的扩展培养体系

——一个研究细胞迁移与增殖协同性的体外模型

Tohru Masui

1 引言

为了研究对正常人类上皮扩展的调节，我们开发了一种扩展培养体系[1]。在摄像机的帮助下，我们观察到细胞的迁移和增殖是以协同方式进行的。例如，上皮扩展物作为一个细胞薄层，是以同心圆的方式向四周扩张的。即使扩展物的大小不同，其中的细胞密度也会保持不变(图 19.1)。细胞薄层扩展半径的增加是一定的(约 1.5mm/d)，与外植体的大小或者供体本身无关。我们能够很轻易地在 3 周内获得含 10^8 个细胞的样品。由于扩展模式是固定的，所以培养物的扩展过程很容易被追踪，与之具有可比性的培养物能够被用于进一步的分析[见注意事项(1)]。

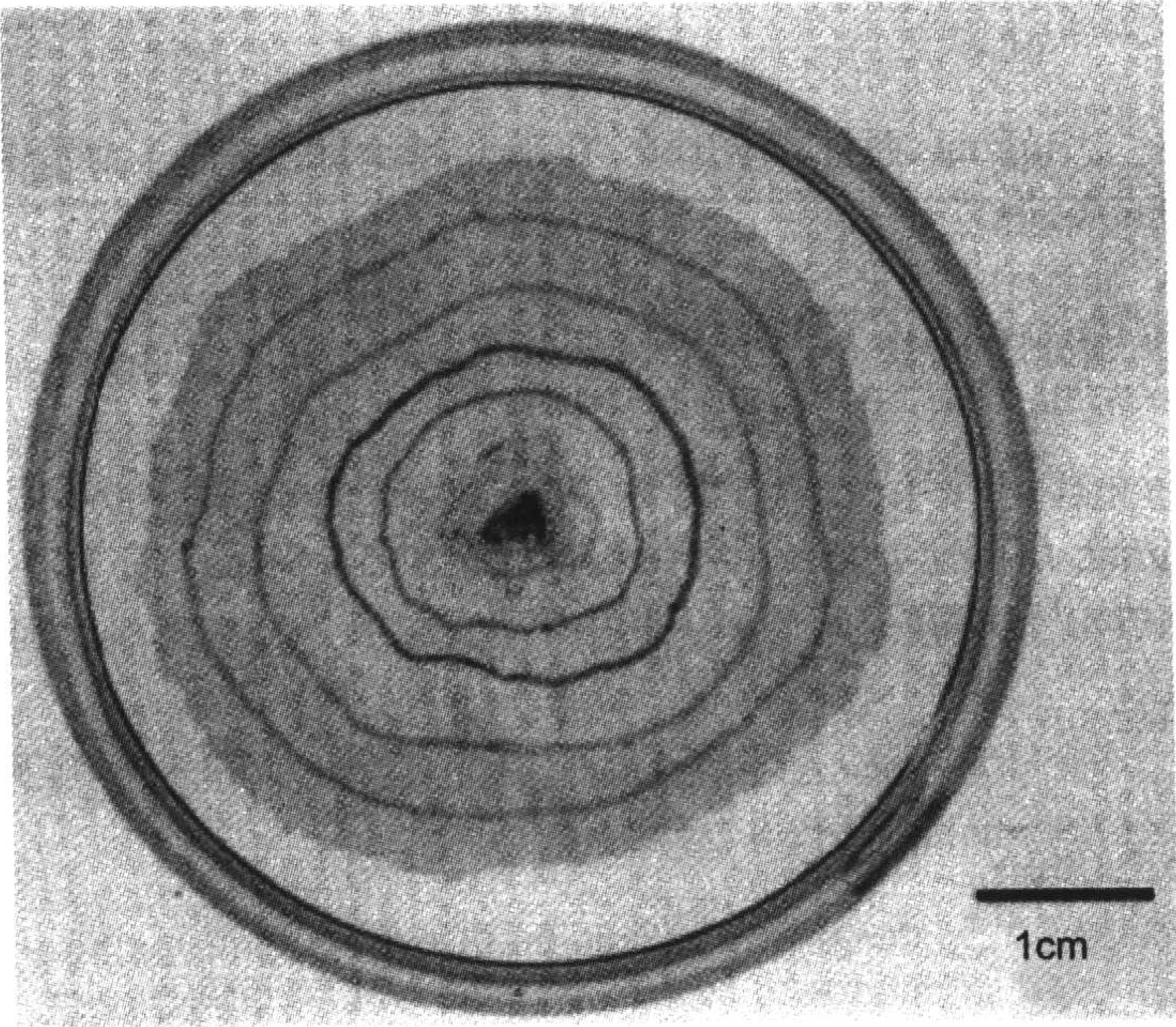


图 19.1 显微镜下，培养在含 4%FBS 的 DMMC 培养液中的扩展物外观
同心圆是对每 2 天的扩展程度的记录

在传统的培养体系中，扩展物是上皮细胞的来源。因此，扩展物中的细胞通常被胰蛋白酶分离后，再以一种设定的方式种植。这个过程对于定量研究培养物是很重要的。但是，定量研究还要求生物反应具有可重复性和一种检测细胞数量的方法。扩展培养体系可以满足上述两个要求，并且我们已经在一系列实验中成功地应用了这一体系。

我们已经阐明，扩展培养体系是一个用于研究正常人类上皮体内生长的、极具吸引力的体外模型[见注意事项(2)]。

214

2 材料

2.1 正常人组织

正常人子宫外颈样本取自接受子宫切除术的子宫肌瘤患者。组织学检查证实无非典型性增生。按照地方法规，获得组织样本前需获得伦理角度的许可。仅有照相记录过的样本被用于本研究。取材时无菌不是必需的。

2.2 工具和塑料器皿

(1) 宽刀片的无菌手术刀(22 号)。

(2) 细尖的剪刀。

(3) 分离上皮层的宽头镊子。

(4) 用于在塑料上做划痕的尖钢针。

(5) 50mL 无菌锥形塑料管。

(6) 100mm 培养皿(Nunc)。

215

2.3 培养液

(1) 清洗液：含 4μg/mL 两性霉素(Life Technologies)和 1%胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养液(Life Technologies)。

(2) 储存液：如果组织被保存在 4℃过夜，应尽量用 Leibovitz 的 L-15 培养液(Life Technologies)作为基础培养液。因为 L-15 的 pH 不会随气相改变而改变，因此适用于过夜保存。

(3) 生长培养液(DMMC)：1∶1 DMEM∶MCDB153HAA 培养液(MCDB)[见注意事项(3)]，含有 1μg/mL 的两性霉素，100U/mL 青霉素(Meiji Seika，日本)，50μg/mL 庆大霉素(Sigma)。MCDB 培养液是特制的，其中不含酚红，但添加有生长因子，并且含有 0.9mmol/L 的 Ca^{2+}。

(4) 包被液：含有 10μg/mL 人纤粘连蛋白(Sigma)、30μg/mL I 型胶原和 100μg/mL 牛血清白蛋白(BSA)(Sigma)的 HEPES 盐缓冲液。

3 方法

3.1 准备培养皿

(1) 在培养皿表面用细针划出约 $1mm^2$ 的区域。通常可以在每个 100mm 的培养皿上划出 3 个区域。这个区域为外植物提供了黏附位点。

(2) 用包被液覆盖培养皿，室温下放置 1h。

3.2 准备样品

(1) 从子宫外颈分离上皮及薄层基质。用镊子夹住上皮，然后用解剖刀片下上皮/基质薄层。

(2) 用剪子将片下的薄层从子宫外颈处剪断。

(3) 用清洗液清洗组织 3 次。

(4) 将样品放在 100mm 的塑料培养皿中，上皮面朝上，切成约 1~3mm^2 的组织块。

(5) 培养皿中加入 3mL 的生长培养液，不要让组织干燥和漂浮在液面上。

(6) 用手术刀切样品。刀片垂直，垂直向下加力切割组织。这种方法对上皮层的损伤最小。避免水平切割，这将会损伤上皮层。

3.3 扩展培养

(1) 将外植物放在培养皿的刻痕区域。

(2) 静置 1h 使外植物附着在培养皿上。

(3) 加入 3mL 的生长培养液。

(4) 将培养皿放进普通的 CO_2 培养箱中。以上步骤应温和地进行，不要干扰外植物的黏附。如果外植物在这一阶段没有黏附成功，那么它们将不能黏附或生长。

216

(5) 第 2 天，给培养物添加入 5mL 生长培养液。

(6) 每隔 2d 给外植物加一次生长培养液。

(7) 培养 5d 后，培养液的体积会增加。

(8) 因为扩展过程中细胞密度是固定的，含有几乎相同细胞数的培养物能够被容易地挑选出来。这些培养物能用于多种进一步的实验。我们已经用它们成功地分析了扩展培养物的生长特性(手稿准备中)。

4 注意事项

(1) 因为细胞密度是固定的[1]，所以可以用扩展面积来衡量细胞数目。每隔 2d 扩展物的轮廓被标记在培养皿底上，再用图像分析的方法来测量面积。这样，我们就能够跟踪每个扩展物的生长情况[1]。

(2) 细胞迁移和增殖的协同性被认为是上皮生长的要素。如前所述，在创伤局部，上皮开始长成并形成细胞薄层[3,4]。对于扩展培养物，外植物将空白区域当作是一个创伤位点并开始生长。因此，这个系统可以为研究初期创伤愈合提供一个合适的模型。

(3) 获得自行配置的高质量 MCDB 培养液可能是个问题。我们正在不断地寻找培养液的新来源，如果这个培养液产品可以被规模生产，日本组织培养协会将对生产这个产品的公司提供支持。如果读者对于培养液的产地有疑问，请与本章作者联系。

(曹宇静　胡　增 译　段恩奎　王　莉 校)

参 考 文 献

[1] Masui,T.(1995)Establishment of an outgrowth culture system to study growth regulation of normal human epithelium.*In Vitro Cell.Dev.Biol.Anim.***31**,440-446.

[2] Shipley,G.D.and Pittelkow,M.R.(1987)Control of growth and differentiation in vitro of human keratinocytes cultured in serum-free medium.*Arch.Dermatol.***123**,1541a-1544a.

[3] Clark,R.A.F. (1985) Cutaneous tissue repair:basic biologic considerations.I. *J. Am. Acad. Dermatol.* **13**,701-725.

[4] Coomber,B.L.and Gotlieb,A.I.(1990)*In vitro* endothelial wound repair:interaction of cell migration and proliferation. *Arteriosclerosis.***10**,215-222.

第 20 章　上皮细胞培养在呼吸道药物转运研究中的应用

217

Jie Shen　Vincent H.L.Lee

1　引言

药物吸入后，可经由整个传导气道吸收：从气管到支气管，再跨过肺泡上皮进入肺的远端。呼吸道的表面积大、血管丰富、酶活性显著降低，这些条件有利于药物向局部和全身的转运。但是，呼吸道不仅结构复杂而且功能也很复杂。因此，在选择模型研究药物在肺部沉积和吸收的影响因素或机制时，一定要考虑到肺的复杂性。研究模型共有 5 大类：① 动物体内的肺 [1~3]；② 肺原位灌注模型；③ 体外分离并灌注的肺或由气管打孔获得的圆片[7~9]；④ 体外分离的呼吸道上皮细胞[7~10]；⑤ 体外培养的上皮细胞单层[11~15]。

呼吸道上皮细胞培养不仅研究了气血屏障特性及其药物在肺部的吸收，而且还排除了肺本身复杂解剖结构对结果的影响，简化了对数据的解释。不同动物的气管和支气管细胞培养物被用于评价多种溶质和药物在传导气道中的渗透性，以及气道上皮对气血屏障特性的调节[12, 13, 16~19]。已有大量文献报道了对体外培养终末肺泡上皮细胞培养的探索，并公布了多种溶质和药物对培养肺泡细胞单层的渗透力的数据[14, 15, 20~26]。

呼吸道上皮细胞的培养，对象包括原代培养物和转化细胞系或癌细胞系。后两者由于自身的永生化增殖，能够源源不断地提供活的上皮细胞。但是，这些细胞通常是去分化的，细胞间缺乏体内正常上皮层特有的紧密连接。转化或癌细胞系的这些缺陷弱化了关于原代培养细胞层是研究药物转运较好材料的争论。本章，我们将重点讲述以研究药物转运为目的的呼吸道上皮细胞原代培养，图 20.1 显示了气管和肺泡上皮细胞培养的主要步骤。

218

2　材料

除特别提到，以下列举的材料可用于两种上皮细胞的培养。

(1) 雄性新西兰白化兔子[见注意事项(1)]。

(2) 消毒的解剖工具包。

(3) 5000U/mL 肝素(钠注射液，USP)(Elkins-Sinn)，用于肺泡上皮细胞培养。

(4) 安乐死注射液：6g/mL 的戊巴比妥钠(Western Medical Supply)。

(5) 缓冲液 A：137.0mmol/L NaCl, 5.0mmol/L KCl, 0.7mmol/L Na_2HPO_4, 10.0mmol/L HEPES 以及 5.5mmol/L 葡萄糖。用于肺泡上皮细胞培养。

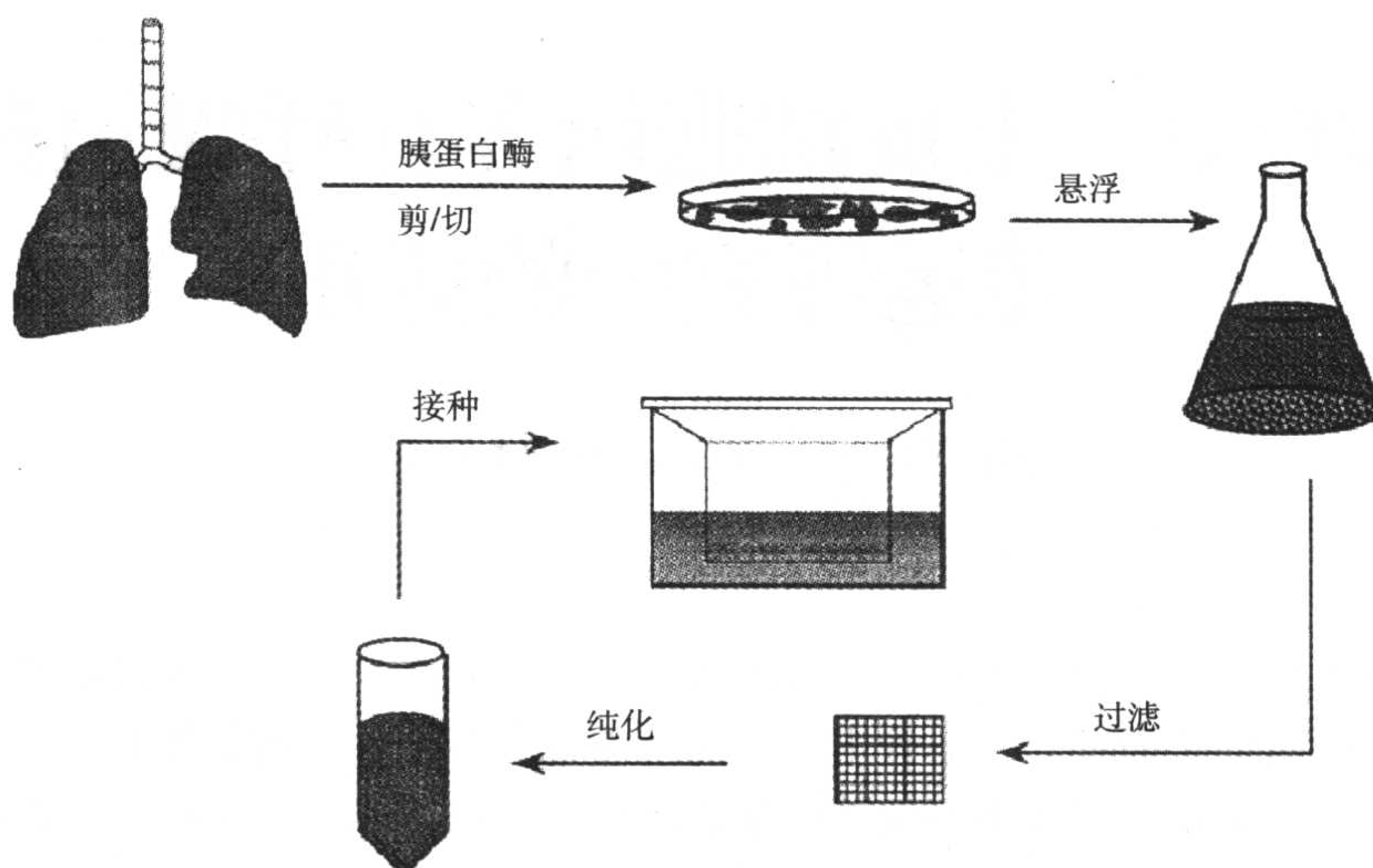


图 20.1　透性膜支持物上，原代支气管和肺泡上皮细胞的分离和培养

(6) 缓冲液 B：137.0mmol/L NaCl, 5.0mmol/L KCl, 0.7mmol/L Na_2HPO_4, 10.0mmol/L HEPES，5.5mmol/L 葡萄糖和 3mmol/L EDTA。用于肺泡上皮细胞培养。

(7) 缓冲液 C：137.0mmol/L NaCl, 5.0mmol/L KCl, 0.7mmol/L Na_2HPO_4, 10.0mmol/L HEPES，5.5mmol/L 葡萄糖，1.2mmol/L $MgSO_4$ 和 1.8mmol/L $CaCl_2$。用于肺泡上皮细胞培养。

219

(8) 猪胰腺弹性蛋白酶(Worthington Biochemical Corporation)。用于肺泡上皮细胞培养。

(9) *Bandeiraea simplicifolia* BS-1 凝集素 (Sigma)。用于肺泡上皮细胞培养。

(10) 脱氧核糖核酸酶 I(DNase I，IV 型)(Sigma)。

(11) 蛋白酶 E(XIV 型)(Sigma)。

(12) 胰蛋白酶抑制剂 (II-S 型:大豆)(Sigma)。

(13) 人重组表皮生长因子(EGF)(Sigma)。

(14) 氢化可的松 (Sigma)。

(15) 牛血清白蛋白 (BSA) (Sigma)。

(16) PC-1 培养基：一种特定培养基。DMEM：F_{12}(Bio Whittaker)为 1∶1 的基础培养基中含有胰岛素、转铁蛋白、脂肪酸，以及其他生长因子和黏附因子。用于气管上皮细胞培养。

(17) DMEM/F12(Life Technologies)。用于肺泡上皮细胞培养。

(18) 无 Ca^{2+} S-MEM(Life Technologies)。

(19) 无 Ca^{2+}和 Mg^{2+}的 Hank 平衡盐溶液(HBSS)(Life Technologies)。

(20) 胎牛血清(FBS)(Life Technologies)。

(21) 两性霉素(Life Technologies)。

(22) 青/链霉素(Life Technologies)。

(23) *L*-谷氨酰胺(Life Technologies)。

(24) 庆大霉素(Life Technologies)。

(25) ITS+Premix：培养添加剂。其中包含胰岛素、转铁蛋白、硒、亚油酸和 BSA (Collaborative Biomedical Product)。用于肺泡上皮细胞培养。

(26) 人类重组纤粘连蛋白(Collaborative Biomedical Products)。

(27) Ⅰ型大鼠尾胶原 (Collaborative Biomedical Products)。

(28) 未包被的光面 Snapwell™ 及 Transwells™。

(29) BRS 溶液: 116.4mmol/L NaCl，5.4mmol/L KCl，1.8mmol/L $CaCl_2$，0.81mmol/L $MgSO_4$，0.78mmol/L NaH_2PO_4。

(30) 5%的 Triton X-100。

(31) 上皮细胞电压计(EVOM™)和一副 STX-2 电极(World Precison Instrument)[见注意事项(5)]。

3 方法

3.1 气管上皮细胞培养

3.1.1 气管上皮细胞分离

(1) 对雄兔实施安乐死后(1mL 溶液/kg 体重)，切下喉和主支气管分叉之间的气管(图 20.2)。

(2) 将切下的支气管放入预冷的 HBSS 中。无菌操作，剪除外面的软骨和结缔组织。

(3) 将切割下的气管切成长度相同(大约 2cm)的 3 块，纵向打开，置于 S-MEM(内含 0.2%的蛋白酶)中，37℃下孵育 90min。

(4) 用镊子夹住气管片，小心地用无菌手术刀刮下上皮细胞层。

(5) 在含有 0.5mg/mL DNase 和 10% FBS 的 S-MEM 中混合细胞。

(6) 室温下，210*g* 离心 10 min。

(7) 吸去上层溶液，在含有 10% FBS 的 S-MEM 中重新悬浮细胞团。

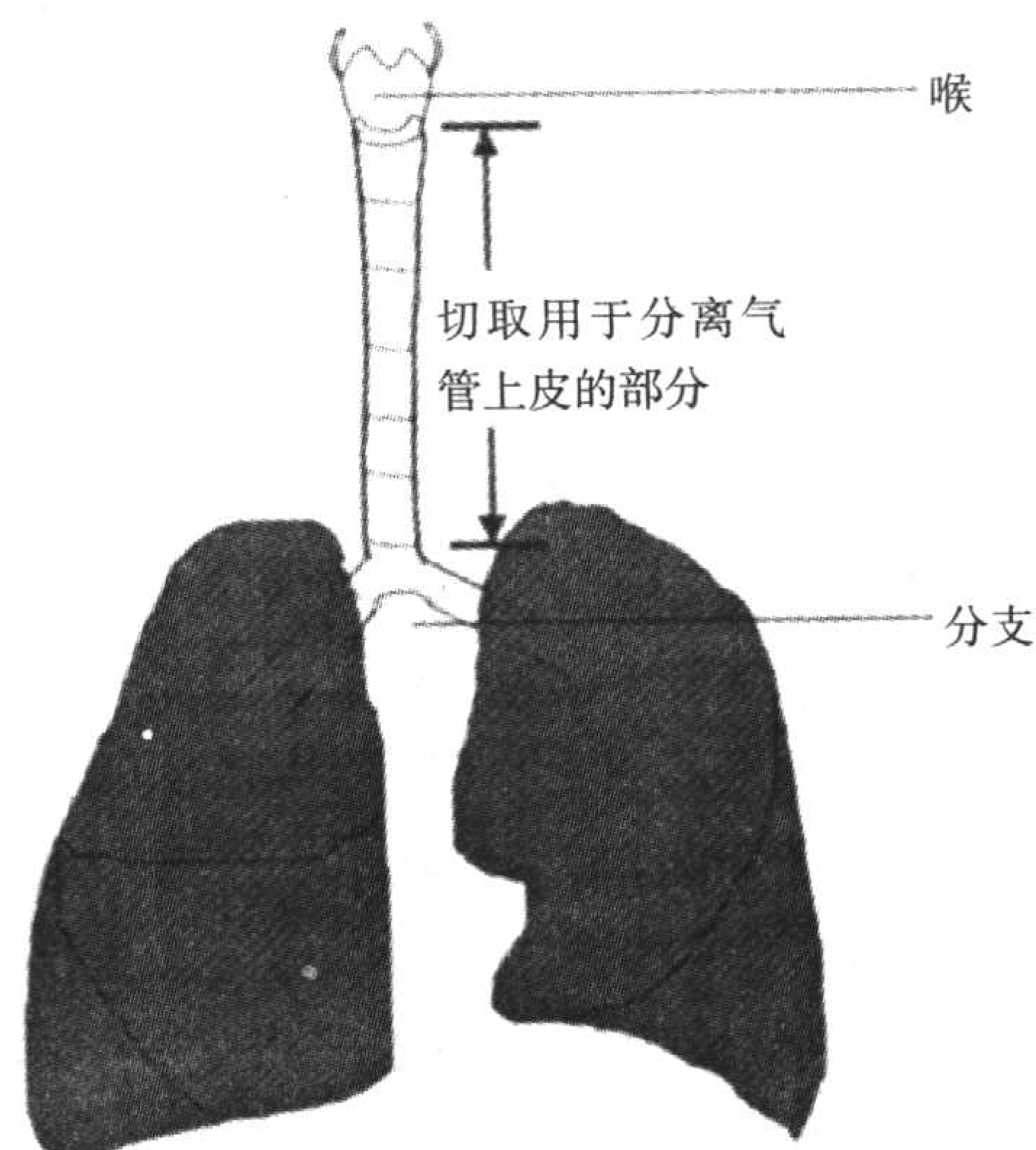


图 20.2 图示切割下来用于分离气管上皮细胞的气管

(8) 重复离心和悬浮各一次。

(9) 用 40μm 滤器过滤细胞悬浮液。

(10) 离心滤液，并在添加 100U/mL 青霉素，50μg/mL 庆大霉素，100μg/mL 链霉素，1μg/mL 两性霉素的 PC-1 培养基中重新悬浮细胞团。

(11) 用台盼蓝染色排除法，测定细胞活力和产量。

220

3.1.2 培养气管上皮细胞

(1) 将分离的气管上皮细胞悬浮液以 1.3×10^6个/cm^2密度，接种到 Transwell 中的透性薄膜支持物上。

(2) 将 PC-1 培养液加入滤膜的底侧部，使培养液与滤膜载体顶部液面持平。

(3) 将细胞置于湿润的，含 95%空气/5%CO_2，37℃的培养箱中培养。

(4) 初次接种后 24h，吸出滤膜上下的培养液。

(5) 用 37℃，95%空气/5% CO_2条件下预平衡过的新鲜 PC-1 培养液小心地清洗贴壁细胞 [见注意事项(4)]。

(6) 在空气界面培养细胞，细胞的上表面直接暴露于空气中。生长培养液仅加在滤膜载体的底侧部，液面与气管上皮细胞上表面持平。

(7) 每天更换生长培养液。

3.1.3 药物转运研究中，气管上皮细胞培养物的监测

从第 3 天开始，用 EVOM 监测跨上皮电阻(TEER，以 kΩ 表示)以及细胞单层的自发电势差(PD，以 mV 表示)[见注意事项(5)]。

3.2 肺泡上皮细胞培养

3.2.1 分离肺泡上皮细胞

221

(1) 给兔子注射肝素(1mL/kg)，以防血液凝结。

(2) 5min 后，注射安乐死溶液(1mL/kg)。

(3) 经由气管插入的 60mL 注射器(潮气量约为 35mL)，给肺人工通气。

(4) 经肺静脉向肺内血管灌注缓冲液 B。

(5) 交替使用缓冲液 A 和缓冲液 B，排空灌注 4 次。

(6) 排空，用缓冲液 C 灌注 1 次。

(7) 排空，用预热到 37℃，含有 2U/mL 猪胰蛋白酶的 S-MEM 40mL 灌注 1 次。

(8) 在每次灌注前，务必将肺部气体完全放出。

(9) 经气管向肺注入 40mL 的 2U/mL 的猪胰弹性蛋酶溶液，在 37℃下孵育 20min。

(10) 再经气管再向肺注入 20mL 的猪弹性蛋白酶溶液，在 37℃再孵育 15min。

(11) 将肺部的气管和支气管切除，将剩余肺组织移到含有 1.67mg/mL 胰蛋白酶抑制剂和 25% FBS 的 S-MEM 溶液中。

(12) 将肺块切碎，转移到无菌培养瓶中[见注意事项(6)]。

(13) 用无菌纱布，40μm 滤器和 15μm 的尼龙筛，过滤肺组织悬液。

(14) 用新鲜的 S-MEM 溶液洗涤所有的滤器。

(15) 4℃、200*g* 离心细胞悬液 4min。

(16) 在含有 16μg/mL 植物血凝素(BS-1)的缓冲液中，重新悬浮细胞团。

(17) 室温下孵育 30min，随后用 40μm 的细胞滤器过滤[见注意事项(7)]。

(18) 离心过滤的细胞悬液，用含有 10% FBS，添加了 100U/mL 青霉素，100μg/mL 的链霉素，50μg/mL 的庆大霉素，1μg/mL 的两性霉素的 DMEM/F12 溶液，重新悬浮

细胞。

(19) 用台盼蓝染色排除法，估测细胞活力。

3.2.2 肺泡上皮细胞培养

(1) 将分离的肺泡上皮细胞悬液以 0.88×10^6 个/cm^2 的密度接种到 Transwell 中的透性薄膜支持物上。

(2) 加入 DMEM/F12 培养液，将滤器载体底侧部浸入其中。

(3) 细胞置于 37℃，95%空气、5% CO_2 的湿润的培养箱中培养。

(4) 接种后 48h，吸去薄膜两侧的生长培养液。

222

(5) 用含有 1% ITS，10ng/mL EGF 及 1μmol/L 氢化可的松的无血清 DMEM/F12 培养液小心清洗黏附细胞。

(6) 在滤膜载体的顶部和底侧部加入无血清 DMEM/F12 培养液。

(7) 每隔一天换一次培养液。

3.2.3 用肺泡上皮细胞单层监测药物转运

从第 3 天开始，用 EVOM 监测跨上皮电阻(TEER，以 kΩ 表示)以及细胞单皮层的自发电势差(PD，以 mV 表示)[见注意事项(5)]。

3.3 培养的上皮细胞单层用于研究药物转运

3.3.1 吸收实验

(1) 接种在透性膜支持物上的肺泡和气管上皮细胞，在上述条件下，都可生长形成极化的细胞层。细胞单层对各种底物吸收的测量，可以在培养细胞单层的顶面和底侧面进行[见注意事项(9)]。Transwell 滤膜有不同的型号可选择(直径分别为 6.5mm、12mm 和 24.5mm)。除特别提示，所有以下细胞均生长在直径为 6.5mm 滤膜上。

(2) 将细胞层置于预定温度(如 4℃或 37℃)的 BRS 缓冲液中平衡 1.5h。

(3) 如进行顶部吸收的测量，则将细胞层的顶部和底侧部培养液吸出。

(4) 将 0.1mL 含有底物的药剂加到细胞层顶部。

(5) 然后将新鲜 BRS 加到底侧部，使底侧部液体与顶端药剂保持同一水平，以避免产生静水压梯度。

(6) 如果进行底侧部吸收的测量，则从细胞层的顶部和底侧部吸出培养溶液。

(7) 在顶部加入 0.1mL 新鲜 BRS，然后在细胞层底侧部添加 0.5mL 一定剂量的药液。

(8) 在适宜温度下，将细胞培养到预定时间[见注意事项(12)]。

(9) 分别吸出滤膜上下的配制药液和样品液，终止实验。

(10) 细胞层在预冷的 BRS 中清洗 6 次。

(11) 用手术刀和剪刀，从 Transwell 中将黏附着细胞层的滤膜取出。

(12) 将滤膜和细胞层在 0.5mL 0.5% Triton X-100 中处理 3h，裂解细胞。

(13) 用 20μL 的细胞裂解液进行蛋白质含量测定[见注意事项(13)]，通过相关分析对剩余的细胞裂解液进行各种物质的定量测定。

223　3.3.2　转运实验

(1) 因为原代培养的肺泡和气管上皮细胞层酷似体内气道和气腔内的上皮层，因此用培养细胞层进行的转运实验可以用于评估这些黏膜层在体内对不同溶质的渗透能力[见注意事项(14)和(15)]。

(2) 在预定温度的(如4℃或37℃)BRS缓冲液中平衡细胞层1.5h。

(3) 如研究从顶端到底侧端的转运，则在细胞层顶端添加0.2mL配制药液，在底侧端添加0.8mL新鲜BRS溶液。

(4) 如研究从底侧端到顶端的转运，要首先向顶部添加0.2mL新鲜BRS，再向底侧部添加0.8mL配制药液。

(5) 在预定时间，来回抽吸样品上下的溶液，以产生旋涡效应。如研究底侧端向顶端的转运，就从顶端回收0.1mL溶液；如研究顶端向底侧端的转运，则从底侧端回收0.2mL溶液。

(6) 用相同体积的新鲜BRS替换被移出的液体。

(7) 使用相关分析法，测定样品中的底物含量。

3.3.3　外流实验

(1) 利用培养在透性薄膜支持物上的细胞层也可以测定细胞薄膜任意一侧的底物外流[见注意事项(16)]。

(2) 将细胞层孵育在含有适当底物浓度(导致最大量底物进入细胞内的浓度)的顶部和底侧部小室内，37℃、1h。

(3) 将黏附有细胞的滤膜用预冷的BRS清洗6次。

(4) 将滤膜移至新的器皿中。

(5) 实验刚开始(时间为0)时，向细胞层顶部添加0.2mL新鲜BRS缓冲液(37℃)，向底侧部添加0.8mL的新鲜BRS缓冲液(37℃)。

(6) 在预定时间点，在样品室(顶部或底部)内上下抽吸液体，以产生旋涡效应。从顶部回收0.1mL溶液，以研究顶端的外流；从底侧部回收0.2mL溶液，以研究底侧端的外流。

(7) 用同样体积的新鲜BRS(37℃)代替移出的液体。

(8) 在外流实验结束时，将附着的细胞层滤膜取出，置于0.5mL的0.5%的Triton X-100中以裂解细胞。

(9) 使用相关的分析方法测定每一样品以及细胞中的底物含量。

3.4　数据分析和计算

3.4.1　吸收实验

(1) 一般以单位时间内积聚在细胞内的底物总量来表示吸收量，被细胞蛋白质含量标准化，标准单位可用如pmol/(min・mg)蛋白质或nmol/(h・mg)蛋白质表示。

224　(2) 如图20.3所示，跨细胞转运可以是被动运输，也可以是主动运输。亲脂性化合物能通过穿细胞途径跨过细胞表面进行被动扩散；亲水性化合物，如甘露醇，则经细胞

旁路径被动扩散进入细胞。溶质也可以通过膜相关转运蛋白或受体介导的内吞/穿胞吞作用，经主动运输进入细胞。为了测定目的底物通过何种路径进入细胞，可以在 37℃下测量底物的吸收总量，在 4℃下测量被动吸收量。主动吸收可用吸收总量与被动吸收量间的差值估算。主动吸收过程具有显著的温度依赖性，37℃时的吸收量远高于 4℃时的吸收量。

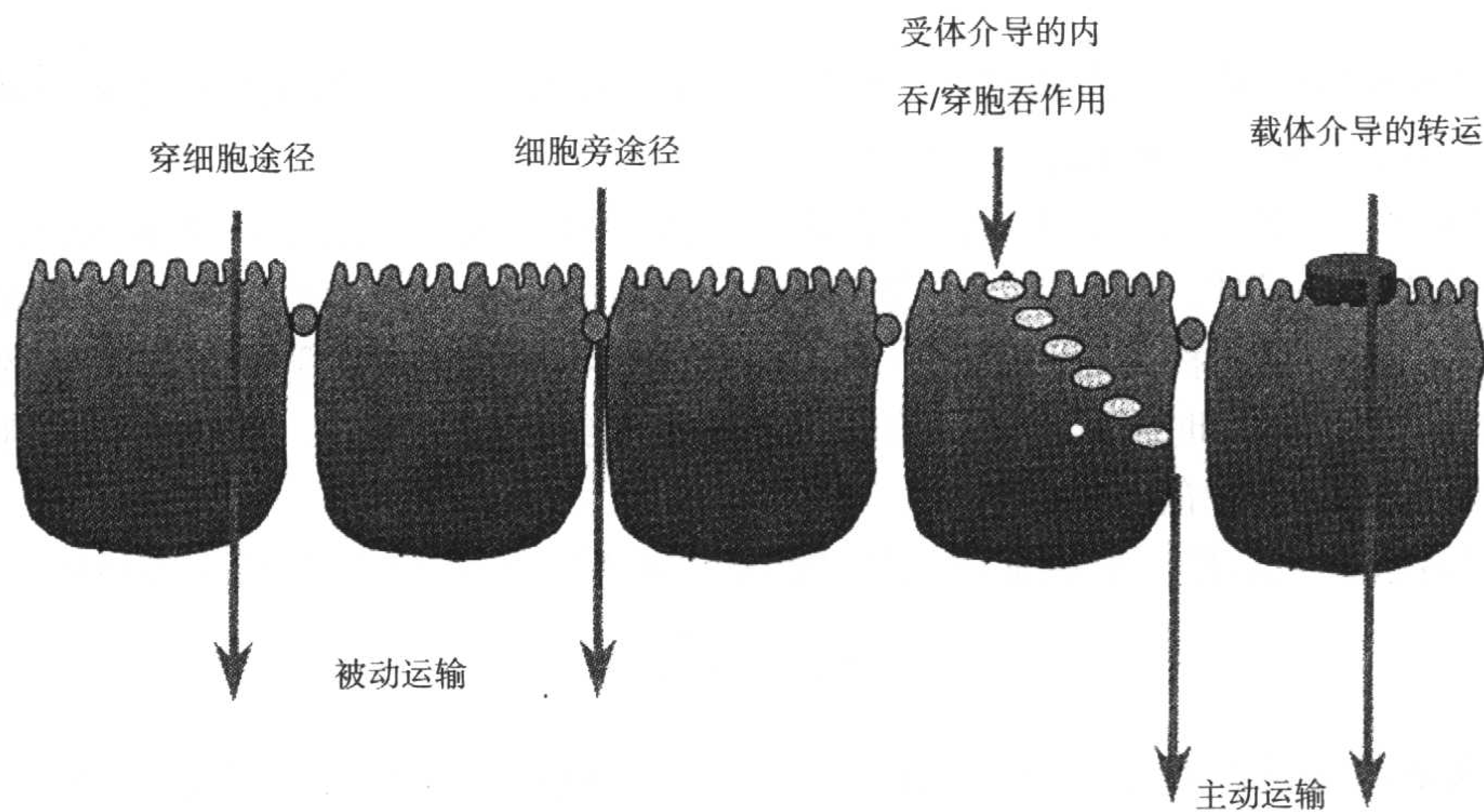


图 20.3　表示溶质转运路径

(3) 吸收量也需针对不同的底物浓度来测量。对于由载体和受体介导的转运过程，如果配制溶液中底物浓度增加，吸收量会呈现饱和。相反，被动吸收过程完全独立于底物的浓度，尽管底物浓度增加，吸收量仍保持线性变化。

(4) 对于有主动吸收参与的吸收过程，吸收量可以由方程 20.1 表示：

$$吸收量=(V_{max}\times C)/(K_m+C)+K_dC \qquad [方程 20.1]$$

式中，V_{max} 表示最大吸收率；K_m 表示最大吸收率达到一半时的底物浓度；C 是配制溶液中的底物浓度；K_d 表示吸收率的非饱和被动系数，它可由 4℃时底物吸收的直线斜率估算[见注意事项(17)]。

(5) 对于载体和受体介导的吸收，还需要同时进行抑制实验。这些研究有助于了解细胞吸收系统中必需的底物-配体化学结构，同时也有助于揭示底物-配体与细胞膜上结合位点之间相互作用的本质。这些信息对于药物设计极有价值。抑制作用可以是竞争性的、非竞争性的或反竞争性的。抑制方式可以通过 Dixon 曲线来判断。竞争性抑制剂其本身可能也是细胞吸收系统的底物，可根据相对亲和力大小对其排序。通常用参数 K_i 表示相对亲和力。K_i 并可用方程 20.2 估算：

225

$$\text{Uptake}^{-1}=K_m[I]/V_{max}\times K_i\times C+(1+K_m/C)/V_{max} \qquad [方程 20.2]$$

式中，[I]表示抑制剂浓度；C 表示底物浓度；K_i 值较小表明抑制剂与吸收系统的亲和力较高。相反，被动吸收对任何物质都无结构性偏好，因而不能被特异性抑制。

3.4.2 转运实验

(1) 转运通常用溶质在单位时间内通过屏障单位横截面的单向(从顶端到底侧端或从底侧端到顶端)流量来表示。如方程 20.3 所示：

$$J=M/(S\times t) \qquad [方程 20.3]$$

式中，J 表示流量；M 表示药物数量；S 表示屏障的表面积；t 表示允许转运的时间。流量的单位有 pmol/(min · cm^2)或 nmol/(h · m^2)

图 20.4 显示了典型的药物转运时间流程。在最初的非稳定状态，转运曲线凸向时间轴；当达到稳定状态时，转运曲线就变成直线。如图 20.4 所示，直线反向延长至时间轴时，其交叉点所指时间称为迟滞时间。迟滞时间是药物穿越上皮细胞层建立稳定的浓度梯度所需的时间。迟滞时间取决于药物转运的速度和细胞层的厚度。曲线中直线部分的斜率就等于方程 20.3 中的流量。

(2) 渗透系数 P_{app} 是一个更常用的描述转运的参数。它可用方程 20.4 来估算：

$$P_{app}=M/(S\times t\times C) \qquad [方程 20.4]$$

式中，C 表示药物初始浓度。因为跨细胞转运通常与药物浓度成正比，与 J 相比，P_{app} 是一个能够更准确地反映出药物跨细胞层转运的内源性渗透能力的参数。P_{app} 的单位为距离/时间，通常以 cm/h 表示[见注意事项(18)和(19)]。

从图 20.4 看出，P_{app} 可用药物浓度 C 与曲线斜率的比值估算。

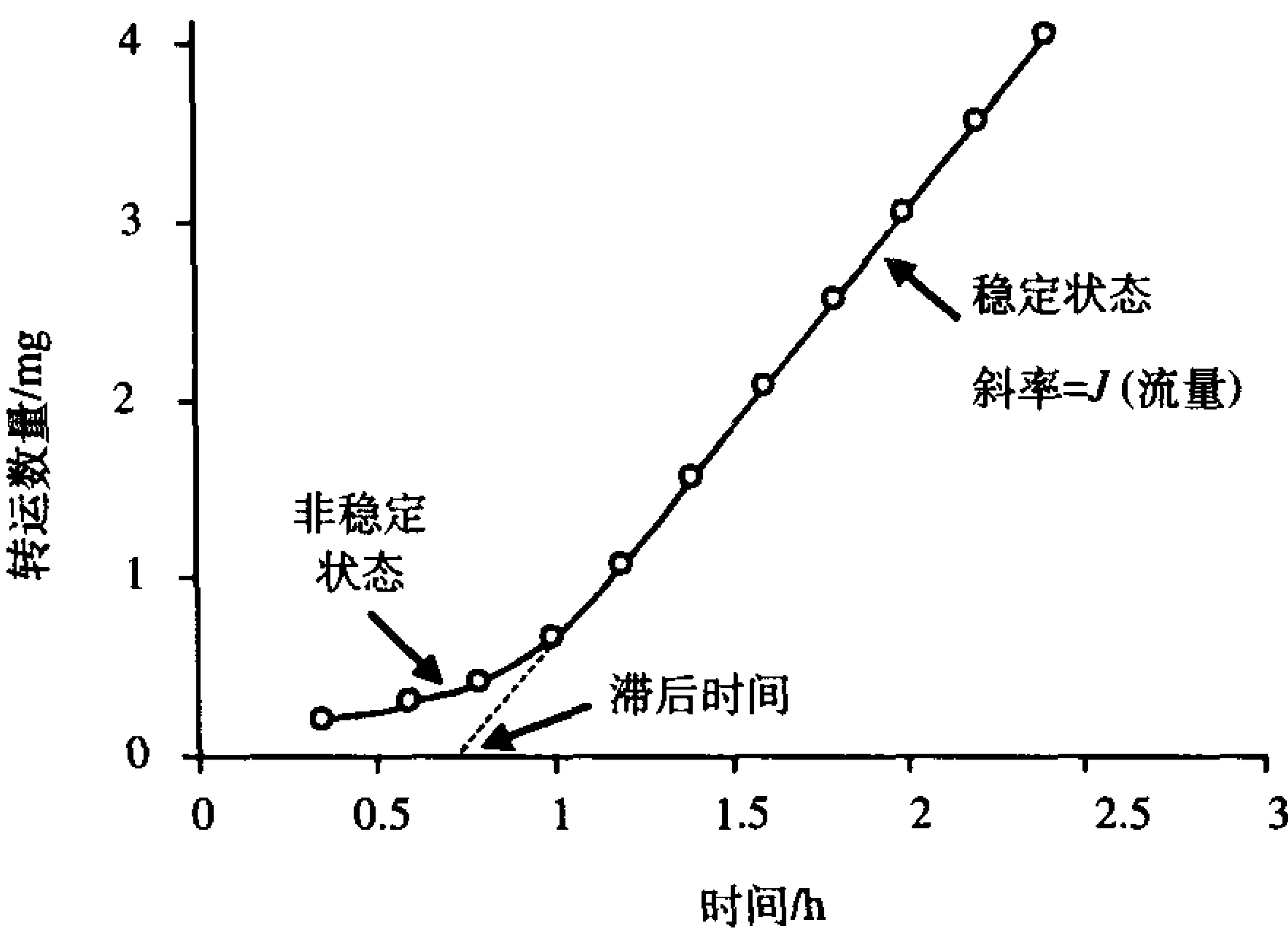


图 20.4 药物转运的时间流程

3.4.3 外流实验

(1) 外流量的测定应在 4℃和 37℃进行，以判断是否有主动运输参与。

226

(2) 如果有主动运输参与，需要在细胞外加入竞争性抑制剂，再测定外流量，以判断外流是跨膜协同还是跨膜抑制的。对于双向载体而言，细胞膜外竞争性抑制剂的存在可以跨膜协同底物的外流。相反，对主要作为外流泵的载体而言，竞争性抑制剂存在会

跨膜抑制底物外流。

4 注意事项

(1) 培养肺泡上皮细胞时，为了最大限度地获得无免疫细胞污染的肺泡上皮细胞，倾向采用年幼(1.2kg)、无特定病原的兔子。相反，培养气管上皮细胞时，为确保从每个动物上收集到大量的上皮细胞，建议采用大体积动物。在分离肺泡上皮细胞的时候，由于需要经气管进行全肺的通气和灌注，所以不能在一只兔子上同时进行肺泡上皮和气管上皮细胞的分离。在透性膜支持物上培养的人和大鼠原代肺泡上皮细胞致密单层，也被其他实验室尝试并应用作研究药物转运的体外模型[15, 30]。关于分离和培养大鼠或人肺泡上皮细胞的详细信息，请参照相关出版物[15, 30]。

(2) 分离的上皮细胞的活力对于培养过程中细胞的分化和增殖十分关键。通常，活力低于 80%的分离细胞无法生长形成研究药物转运需要的致密细胞单层。

(3) Transwell 透性膜载体需用胶原蛋白和纤粘连蛋白预先包被。载体于 37℃，在含有 11.25μg/mL BSA、10μg/mL 重组人纤粘连蛋白和 45μg/mL I 型鼠尾胶原蛋白的 DMEM/F12 中孵育 2h，在接种细胞前吸出包被液。

227

(4) 清洗步骤能去除一些未贴壁的细胞，这些细胞可能是无活力的气管细胞或是分离过程中掺杂的污染细胞，如红细胞。

(5) 上皮层是由细胞间连接复合体(紧密连接、中间连接和桥粒)所连接的单层或多层细胞。这些紧密连接阻止了离子的侧向自由扩散，细胞层两侧可以检测到跨上皮电阻。如果没有紧密连接，溶质(包括药物和离子)就能在相邻细胞间快速扩散，跨上皮电阻(TEER)不易被检测。研究表明，上皮细胞能主动转运离子，如 Na^+、Cl^-的主动运输是通过细胞质膜表面的多种离子渠道和转运体等载体完成的。例如，体内肺泡上皮细胞可主动吸收 Na^+，目的是清除肺泡内的液体。净的主动运输离子产生电流，也形成了跨膜的自发电势(PD)。因此，TEER 和 PD 成为对培养细胞层活力及其是否适合用作药物吸收和转运研究进行评价的两个指标。通常采用 EVOM 和 STX-2 电极测量 TEER 和 PD。对生长在空气界面上的气管细胞，在 95%空气、5%CO_2、37℃培养箱中预平衡过的培养液必须同时添加到细胞的顶部和底侧部，这样做的目的是使一对 STX-2 电极可以置于溶液两侧，以便于测量跨细胞层的 TEER 和 PD。要得到一个约为 70mV 的 PD 峰值，需要发育约 5d 的上皮层；得到一个大约 1.2kΩ · cm^2 的 TEER 峰值，需要发育约 7d 的上皮层。

(6) 此时，应不停地晃动或上下吹吸的细胞悬液，以使肺泡上皮细胞与底部支持膜分离。

(7) 来自 *Bandeiraea simplicifolia* 的植物血凝素能结合血红细胞和肺泡巨噬细胞上的糖蛋白。血凝素与肺泡上皮细胞悬浮液共孵育，能沉淀这两种污染细胞，达到净化肺泡上皮细胞的目的。

(8) 预计需要将肺泡上皮细胞培养 6d 以获得 1.98±0.02kΩ · cm^2 的 TEER 峰值和 34.5±0.8mV 的 PD。

(9) 可使用本章描述的原代细胞培养物模型测量溶质和(或)药物的吸收量，这种培养模式的优点是极化细胞层的顶部和侧底侧部细胞膜都可用于吸收量的检测。这个模式有

助于区别鉴定细胞层两个膜结构域的底物吸收活动，因为在上皮细胞中观测到许多极化分布转运蛋白，对两个膜结构的区别鉴定就显得非常重要[34~36]。而且，吸收实验也有助于了解多步穿细胞转运过程中的限速步骤。

(10) 在进行肺泡上皮细胞的吸收和转运实验中，在含有 0.5%BSA 的 BRS 液里平衡细胞是十分必要的，其目的是在长时间(5h)内保持细胞高的 TEER 值。但是对于气管细胞而言，BRS 缓冲液中含有的 BSA 对维持致密细胞单层的完整性似乎并不必要。

228

(11) 使用具有最佳生物电参数的细胞层对研究底物吸收和转运非常关键的[见注意事项(5)、(8)]，这些参数是细胞间致密连接形成和离子转运活动的指标。如果使用渗漏的细胞层定量测定顶部与侧底侧部膜吸收量，则无法确定实际的吸收位点。相反，如果用渗漏的细胞层研究转运，会导致细胞旁转运的较多参与整个转运过程，因而对目的上皮细胞内渗透能力的估测会出现偏差。

(12) 由于吸收率未知，进行初次吸收实验时，在多个短时间段(30s、1min、5min、10min 等)取样很重要。这一步骤被称为吸收时间的测定，它排除了底物外流或代谢的干扰，使我们能够确定吸收的初始线性期。但是，如果初始样品是在超过了一定时间后收集的，所测得的吸收量可能反映的是吸收和外流之间的达到平衡态时的净积累，而不是真实吸收活动的结果。一旦初始线性吸收的时间段被确定，随后的吸收实验要在等于或短于时间段内取样。

(13) 直接检测细胞总数很不方便。所以，即使培养细胞层的吸收量与细胞总数直接相关，仍需测定细胞层内的蛋白质含量，用于标准化溶质吸收量。

(14) 转运实验可以通过在细胞层上部(测量顶端到底侧端的转运)和底侧部(测量底侧端到顶端的转运)加入定量配制的药液来实现。应使用包被胶原蛋白和纤维蛋白的空白滤膜作为对照，以便评价渗透性膜自身是否明显阻碍了溶质转运。空白对照实验对评价亲脂性化合物的渗透性尤其重要。

(15) 所有的转运实验都应测定甘露醇流量，以便纠正细胞旁渗透带来的偏差。甘露醇是一种普遍使用的细胞旁转运标志物，它仅经由细胞旁途径穿过细胞层。因而甘露醇的渗透性可用于检测细胞层的完整性。

(16) 同吸收的测定类似，外流的测定对于鉴定在上皮细胞中极化分布的转运蛋白(如 P-糖蛋白)功能尤其重要[37]。

(17) 可用来非线性最小平方回归分析程序(如 Prism™)整合实验数据以及计算 3 个参数(V_{max}、K_m 和 K_d)。V_{max} 和 K_m 还被称为 Michaelis-Menten 参数，它们描述了底物的吸收动力学，V_{max} 描述了吸收能力，而 K_m 描述了细胞吸收系统对特定底物的亲和力。

229

(18) 不论经由穿细胞途径还是细胞旁途径，跨细胞层被动扩散的 P_{app} 与药物浓度无关。相反，对于一个可饱和过程，如载体介导的跨细胞转运，P_{app} 随着药物浓度的增加而降低。

(19) 原代培养的兔肺泡上皮细胞，细胞旁转运标志物甘露醇的 P_{app} 值约为$(1.01\pm0.03)\times10^{-7}$ cm/s，而原代培养的兔气管上皮细胞的 P_{app} 值为$(1.2\pm0.3)\times10^{-7}$cm/s。如果一个与甘露醇大小相似的亲水性化合物，具有与甘露醇相似的 P_{app}，那么，它可能就是经由细胞旁途径穿过上皮细胞层的。相反，如果目的化合物的 P_{app} 高于甘露醇，那么必定有主动转运成分存在参与该化合物的跨细胞转运，因为亲水性化合物无法经上皮细胞

膜自由扩散。

(20) 对双向转运蛋白质而言，细胞外竞争性抑制剂的存在为底物互换提供了驱动力。因此，抑制剂经载体介导转运至细胞内后，会提高细胞内积聚底物的外流。这种现象已见报道[38,39]。相反，对于专门负责外流的转运蛋白质而言，例如，P-糖蛋白和多药耐药蛋白(MRP)，细胞外竞争性抑制剂可能占据载体上的结合位点，因而阻止载体将细胞内的底质泵出细胞外。上述观察结果导致了应用竞争性抑制剂(如 P-gp 和 MRP)来增加细胞毒性药物在胞内的累积，用于治疗癌症。

(刘泽隆　胡　增译　李　晶　王　莉校)

参 考 文 献

[1] Folkesson, H. G., Westrom, B. R., Pierzynowski, S. G., Svendsen, J., and Karlsson, B. W. (1993) Lung to blood passage of albumin and a nonapeptide after intratracheal instillation in the young developing pig. Acta *Physiol. Scand.* **147**,173-178.

[2] Folkesson, H. G., Westrom, B. R., Dahlback, M., Lundin, S., and Karlsson, B. W. (1992) Passage of aerosolized BSA and the nona-peptide dDAVP via the respiratory tract in young and adult rats. *Exp. Lung Res.* **18**,595-614.

[3] Enna, S. J. and Schanker, L. S. (1972) Absorption of drugs from the rat lung. *Am. J. Physiol.* **223**,1227-1231.

[4] Ma, T., Fukuda, N., Song, Y., Matthay, M. A., and Verkman, A. S. (2000) Lung fluid transport in aquaporin-5 knockout mice. *J. Clin. Invest.* **105**,93-100.

[5] Saumon, G., Soler, P., and Martet, G. (1995) Effect of polycations on barrier and transport properties of alveolar epithelium in situ. *Am. J. Physiol.* **269**, L185-L194.

[6] Rannels, D. E., Pegg, A. E., Clark, R. S., and Addison, J. L. (1985) Interaction of paraquat and amine uptake by rat lungs *perfused in situ. Am. J. Physiol.* **249**,E506-E513.

[7] Charon, J. P., McCormick, J., Mahta, A., and Kemp, P. J. (1994) Characterization of sodium-dependent glucose transport in sheep tracheal epithelium. *Am. J. Physiol.* **267**, L390-L397.

230

[8] Saldias, F. J., Comellas, A., Guerrero, C., Ridge, K. M., Rutschman, D. H., and Sznajder, J. I. (1998) Time course of active and passive liquid and solute movement in the isolated perfused rat lung model. *J. Appl. Physiol.* **85**, 1572-1577.

[9] French, M. C. and Wishart, G. N. (1985) Isolated perfused rabbit lung as a model to study the absorption of organic aerosols. *J. Pharmacol. Methods* **13**, 241-248.

[10] Murata, M., Tamai, I., Sai, Y., Nagata, O., Kato, H., and Tsuji, A. (1999) Carrier mediated lung distribution of HSR-903, a new quinolone antibacterial agent. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **289**, 79-84.

[11] Kim, K. I., Matsukawa, Y ., Lee, V. H.L., and Crandall, E. D. (1995) Characteristics of albumin absorption across rat alveolar epithelial cell monolayers. *FASEB J.* **9**, A569.

[12] Yamashita, F., Kim, K. I., and Lee, V. H. (1998) Dipeptide uptake and transport characteristics in rabbit tracheal epithelial cell layers cultured at an air interface. *Pharm. Res.* **15**, 979-983.

[13] Mathias, N. R., Kim, K. I., Robinson, T. W., and Lee, V. H.L. (1997) Development and characterization of rabbit tracheal epithelial cell monolayer models for drug transport studies. *Pharm. Res.* **12**,1499-1505.

[14] Shen, J., Elbert, K. J., Yamashita, F., Lehr, C.-M., Kim, K.-J., and Lee, V. H.L.(1999) Organic cation transport in rabbit alveolar epithelial cell monolayers. *Pharm. Res.* **16**, 1279-1286.

[15] Elbert, K. J., Schäfer, U. F., Schäfers, H.-J., Kim, K. J., Lee, V. H.L., and Lehr,C.-M. (1999) Monolayers of human alveolar epithelial cells in primary culture for pulmonary absorption and transport studies. *Pharm. Res.* **16**,601-608.

[16] Mathias, N. R., Kim, K. J., and Lee, V. H. (1996) Targeted drug delivery to the respiratory tract: solute permeability of air-interface cultured rabbit tracheal epithelial cell monolayers. *J. Drug Target.* **4**, 79-86.

[17] Yamashita, F., Kim, K. J., and Lee, V. H. (1997) Gly-L-Phe transport and metabolism across primary cultured rabbit tracheal epithelial cell monolayers. *Pharm. Res.* **14**, 238-240.

[18] Yu, X. Y., Undem, B. J., and Spannhake, E. W. (1996) Protective effect of substance P on permeability of airway epithelial cells in culture. *Am. J. Physiol.* **271**, L889-L895.

[19] Devalia, J. L., Godfrey, R. W., Sapsford, R. J., Severs, N. J., Jeffery, P. K., and Davies, R. J. (1994) No effect of histamine on human bronchial epithelial cell permeability and tight junctional integrity *in vitro*. *Eur. Respir. J.* **7**,1958-1965.

[20] Morimoto, K., Yamahara, H., Lee, V. H.L., and Kim, K. J. (1993) Dipeptide transport across rat alveolar epithelial cell monolayers. *Pharm. Res.* **10**, 1668-1674.

[21] Saha, P., Kim, K. J., and Lee, V. H.L. (1994) Influence of lipophilicity on β-blocker transport across rat alveolar epithelial cell monolayers. J. *Control. Rel.* **32**,191-200.

[22] Morimoto, K., Yamahara, H., Lee, V. H.L., and Kim, K. J. (1994) Transport of thyrotropin-releasing hormone across rat alveolar epithelial cell monolayers. *Life. Sci.* **54**, 2083-2092.

231 [23] Matsukawa, Y., Yamahara, H., Yamashita, F., Lee, V. H., Crandall, E. D., and Kim, K. J. (2000) Rates of protein transport across rat alveolar epithelial cell monolayers. *J. Drug Target* **7**, 335-342.

[24] Matsukawa, Y., Lee, V. H., Crandall, E. D., and Kim, K. J. (1997) Size-dependent dextran transport across rat alveolar epithelial cell monolayers. *J. Pharm. Sci.* **86**, 305-309.

[25] Matsukawa, Y., Yamahara, H., Lee, V. H., Crandall,E. D., and Kim, K. J. (1996) Horseradish peroxidase transport across rat alveolar epithelial cell monolayers. *Pharm. Res.* **13**,1331-1335.

[26] Forbes, B., Wilson, C. G., and Gumbleton, M. (1999) Temporal dependence of ectopeptidase expression in alveolar epithelial cell culture: implications for study of peptide absorption. *Int. J. Pharm.* **180**, 225-234.

[27] Gruenert, D. C., Finkbeiner, W. E., and Widdicombe, J. H. (1995) Culture and transformation of human airway epithelial cells. *Am. J. Physiol.* **268**, L347-L360.

[28] Foster, K. A., Oster, C. G., Mayer, M. M., Avery, M. L., and Audus, K. L. (1998) Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism. *Exp. Cell Res.* **243**, 359-366.

[29] Segel, I. H. (1976) Enzymes, p. 208-319. In *Biochemical calculations.* New York.

[30] Cheek, J. M., Kim, K. J., and Crandall, E. D. (1989) Tight monolayer of rat alveolar epithelial cells: bioelectric properties and active sodium transport. *Am. J. Physiol.* **256**, C668-C693.

[31] Kim, K. J., Cheek, J. M., and Crandall, E. D. (1991) Contribution of active Na^+ and Cl^- fluxes to net ion transport by alveolar epithelium. *Respir. Physiol.* **85**,245-256.

[32] Goodman, B., Kim, K.-J., and Crandall, E. D. (1987) Evidence for active sodium transport across alveolar epithelium of isolated rat lung. *J. Appl. Physiol.* **62**,703-710.

[33] Simon, R. H., McCoy, J. P., Chu, A. E., Dehart, P. D., and Goldstein, I. J. (1986) Binding of Griffonia simplicifolial I lectin to rat pulmonary alveolar macrophages and its use in purifying type II alveolar epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta.***885**, 34-42.

[34] Lubman, R. L., Chao, D. C., and Crandall, E. D. (1995) Basolateral localization of Na^+-HCO_3^- cotransporter activity in alveolar epithelial cells. *Respir. Physiol.***100**,15-24.

[35] Oelberg, D. G., Xu, F., and Shabarek, F. (1994) Sodium-coupled transport of glucose by plasma membranes of type II pneumocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1194**, 92-98.

[36] Gaillard, D., Ruocco, S., Lallemand, A., Dalemans, W., Hinnrasky, J., and Puchelle, E. (1994) Immunohistochemical localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in human fetal airway and digestive mucosa. *Pediatr. Res.* **36**, 137-143.

[37] Lechapt-Zalcman, E., Hurbain, I., Lacave, R., et al. (1997) MDR1-Pgp 170 expression in human bronchus. *Eur. Respir. J.* **10**,1837-1843.

[38] Temple, C. S., Stewart, A. K., Meredith, D., et al. (1998) Peptide mimics as substrates for the intestinal peptide transporter. *J. Biol. Chem.* **273**,20-22.

232 [39] Takeuchi, A., Masuda, S., Saito, H., Hashimoto, Y., and Inui, K. (2000) Transstimulation effects of folic acid derivatives on methotrexate transport by rat renal organic anion transporter, OAT-Kl. J. Pharmacol. *Exp. Ther.* **293**, 1034-1039.

[40] Larrivee, B. and Averill, D. A. (2000) Modulation of adriamycin cytotoxicity and transport in drug-sensitive and multidrug-resistant Chinese hamster ovary cells by hyperthermia and cyclosporin A. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **45**,219-230.

第21章　上皮细胞培养物在药物转运研究中的应用

233

Staffan Tavelin, Johan Gråsjö, Jan Taipalensuu, Göran Ocklind,
Per Artursson

1　引言

应用上皮细胞系研究药物转运过程颇受欢迎，原因可能是这个体外模型虽然简单，却是提供新信息的简便工具。采用透性支持物上生长的上皮细胞单层研究药物运输，整个过程更容易被人为控制，可以获得大量的信息。由于同源的上皮细胞培养物不像完整组织模型那样复杂和多变，因此获得的这些信息通常可相对容易的被解释成基本原理。事实上，我们最近发现的许多关于药物主动和被动运输机制都来源于对各种上皮细胞培养物的研究[1]。由于药物通过上皮细胞单层的被动运输与人体内小肠上皮的被动运输有良好的相关性，因此上皮细胞培养物就可能应用于结构-吸收关系的研究(例子见参考文献[2]~[4])。事实上，细胞培养和单层上皮细胞参与的转运实验已经实现自动化。这些模型现已被多家制药公司用于预测小肠内药物的渗透性，成为新药研制的筛查工具。

本章介绍了我们实验室利用透性支持物上生长的上皮细胞单层研究药物被动和主动转运的基本方法。细胞培养物性能的可重复性是研究口服药物转运的一个基本条件，因此这里首先介绍了细胞单层的鉴定和质量监控方法。最后介绍了计算上皮细胞转运最常用的数学表达法。虽然这些方法是为应用广泛的人小肠上皮细胞系 Caco-2 而设计的，它们也适用于其他形成单层的上皮细胞系。

234

2　材料

2.1　细胞

Caco-2 是研究药物转运动力学最常用的上皮细胞系,它来源于人的结肠腺癌[5]。这个细胞系被广泛应用的原因在于：① 尽管它是癌源细胞，但它与体内对应细胞具有行为相似性[6]；② 它来源于人；③ 口服是最重要的给药途径，药物经小肠的吸收程度决定了候选药物临床应用的成功与否[7]；④ 首次发现药物体外渗透和体内吸收之间具有相关性就是基于对这种细胞系的研究[2]。Caco-2 细胞可由多种途径获得，包括美国典型菌种保藏中心(American Type Culture Collection，ATCC)(http://www.atcc.org/)和欧洲细胞培养物保藏中心(European Collection of Cell Culture，ECACC)(http://www.ecacc.org/)。Caco-2 细胞具有与肠(吸收性)上皮细胞相似的形态和功能[8, 9]。它们能形成紧密连接，表达多种刷状缘酶，一些 CYP450 同工酶和几种 II 期酶，如谷胱甘肽-S-转移酶、磺基转移酶和葡萄糖醛(苷)酸酶。这些酶对于药物的系统前代谢研究有重要意义[10~12]。最近又开发出在

Caco-2 细胞上诱导 CYP450-3A4 基因功能性表达的方法[13]。Caco-2 细胞系存在小肠上皮细胞中发现的多种主动转运系统，其中包括可用来转运糖类、氨基酸、多肽和维生素的转运体系[14~21]。此细胞系也被广泛用于研究外流体系，如 P-糖蛋白(P-gp)和多药耐药相关蛋白(MRP)对肠道药物转运的影响[22~25]。这个细胞系的分化程度极高，能够在含正常浓度血清的培养液中发生自动分化，Caco-2 细胞系因此成为研究上皮完整性和转运的最受欢迎的细胞系。但是，该细胞系可能会由于传代次数的差异导致应用过程中呈现不同的特征。因此，实验采用确定在一定传代次数范围内的细胞很重要。从 ATTCC 和 ECACC 获得的 Caco-2 细胞，其传代次数通常为 20~40 代，而我们的实验采用 90~105 代的 Caco-2。我们对这些 Caco-2 细胞进行了彻底鉴定，结果发现处于这个传代间隔的细胞的完整性保持得非常稳定。如果应用本文介绍的这个成熟的培养方法，Caco-2 细胞分化需要 21d[26]。近来也出现了几种能够不同程度(一般少于一周)加快其分化过程的培养方法[27, 28]，其中至少有一种方法已被商业化并经过评估(http://www.bd.com/labware)[29]。但有关这些快速培养物生物学表现的信息比较有限。因此，必须对这种采用加速法培养的 Caco-2 细胞进行彻底的鉴定，以验证这些方法的可重复性。

235

由于 Caco-2 细胞系的培养方法比较费时，这就加速了对其他上皮细胞系的评估(表 21.1)。一些细胞系具有与比 Caco-2 更类似于人肠上皮的某种单一特性。例如，2/4A1 细胞形成的渗漏单层就能更好的模拟药物在小肠上皮的被动渗透。其他细胞系(如 MDCK 和 LLC PK_1)由于能低水平地内源性表达转运蛋白而被广泛应用，它们适合作为表达体系，如某些 ABC 转运子[30]。

236

表 21.1 用于药物转运研究的可形成单层的上皮细胞系举例

细胞系	来源	主要特征	参考文献
Caco-2	人结肠腺癌	肠绒毛上皮样，自发分化	[11]、[31]
T84	人结肠腺癌	腺窝细胞样	[32]、[33]
HT29	人结肠	杯状细胞样，形成黏液层 腺窝细胞样，渗漏	[34]、[38]
IEC 细胞系	大鼠胚胎小肠上皮		
2/4A1	大鼠胚胎肠上皮	腺窝细胞样，渗漏，温度敏感性分化	[3]、[39]
LLC PK_1	猪肾脏上皮	低水平表达外流系统，转运蛋白表达体系	[33]，[40~43]
MDCK	犬肾脏上皮	低水平表达外流系统，转运蛋白表达体系	[4]、[30]、[44]

2.2 仪器和消耗品

除了细胞生长和维持所需的一般性设备外，尚需要以下仪器和材料。用于鉴定透性支持物上生长的细胞单层和其他用途所需的备选仪器，会在方法描述过程中提到。

(1) 透性细胞培养支持物：不同供应商提供多种商品化的细胞培养透性支持物(表 21.2)。细胞培养支持物有不同尺寸(如直径为 6.5mm、12mm、24mm 和 98mm)。支持细胞生长的多孔膜通常由多聚碳酸盐、纤维素或具有相似特性的材料制成。我们优先选择

多聚碳酸盐滤器，因为 Caco-2 细胞无需细胞外基质，如胶原蛋白类就可以直接黏附在这种支持物上。此外亲水性多聚碳酸盐支持物不会限制水和大多数药物的扩散。透性支持物的孔径从 0.1~3.0μm，也有不同的选择。支持物的孔密度也不同。低孔密度由于不透明度低适用于透射显微分析研究，高孔密度则适用于研究药物转运。大多数透性支持物置于多孔培养板内运输。还需要准备没有透性支持物的多孔板用于转运实验。我们通常使用直径为 12mm 和孔径为 0.4μm 的细胞培养支持物。为简单起见，在以下的方法中，所有体积和时间间隔都根据此规格支持物进行优化。在透性支持物上生长上皮细胞的方法如图 21.1 所示。

表 21.2　适用于显微技术或药物转运研究的细胞培养支持物

公司/名称	材料[a]	评价[b]	网址
Becton Dickinson			http://www.bd.com/labware/library/cellculture.html
BD Falcon™	PWT	显微观察	
	FP	药物转运	
BD Biocoat™	FP,PET	用胞外基质预包被(I 或 IV 型胶原，层粘连蛋白，纤粘连蛋白，人工基质)	
Corning Costar®			http://www.scienceproducts.corning.com/
Transwell	PC	药物转运	
Transwell-Clear	PC	显微观察	
Transwell-COL	PC	牛 I 和 III 型胶原预包被	
Snapwell	PC	自分离过滤器，适合做特异性扩散小室的内衬，如研究电生理特性	
Millipore			http://www.millpore.com/analytical/products.nsf/docs/millicell
Millicell	CM	显微观察	
	HA	显微观察	
	PCF	药物转运	
NUNC®			http://nunc.nalgenun.com/products/catalog/cellculture/grl-18.html
Anopore® membrance	n/a	显微观察	
Polycarbonate membrane	PC	药物转运	

[a]PET(聚乙烯对苯二甲酸酯)、FP(亲水纤维素含氟高分子)、PC 和 PCF(多聚碳素盐)、(聚苯乙烯)、HA(混合的纤维酯)、n/a(无相关信息)。

[b]可从供应商的网站获得更多评价特殊支持物应用的信息。

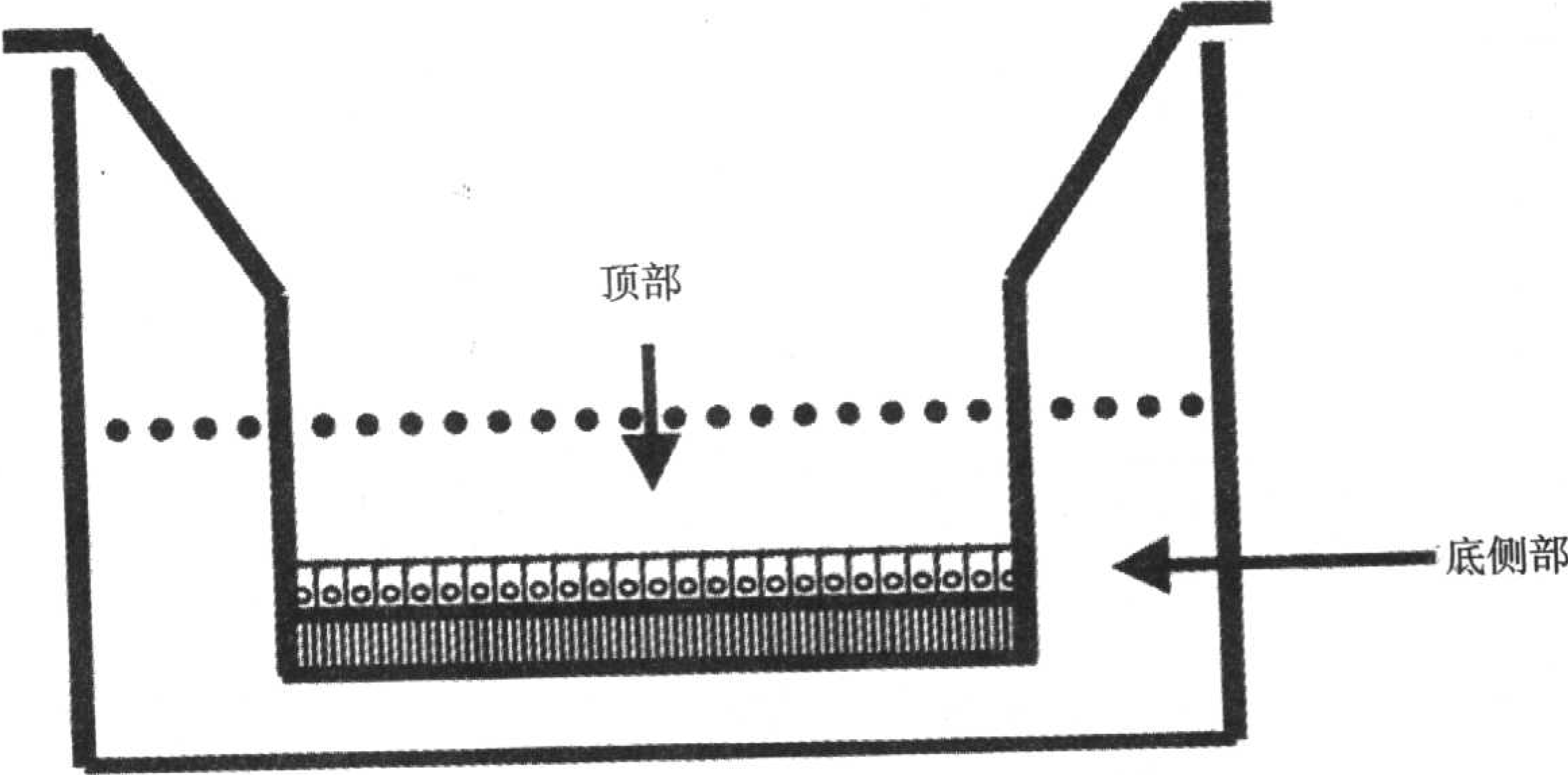


图 21.1　图示生长在透性支持物上的上皮细胞单层

图中箭头表示顶部和底侧室。虚线代表两侧培养液的表面位置

(2) 37℃的培养箱、水浴锅和保温板：在转运实验进行期间，温度的控制十分重要，因为细胞层的完整性与温度相关，因此药物转运率也是温度相关的。所以应用透性支持物上生长的上皮细胞单层进行的实验都要在37℃培养箱中进行，所有的缓冲液也都要水浴加热。为了避免加样过程中细胞单层快速冷却，我们自行设计了专门为细胞培养皿加热的保温板。也有多种同样用途的保温产品可以选择，如 Kitazato 显微台式保温器(http://www.kitazatosupply.com/e-index.html)。在使用板式保温器前，必须要检查温度的区域性差异。

(3) 培养板振荡器：培养板振荡器放置培养箱中，用来摇动支持物。用常规的盘式振荡器以 100~500r/min 的速度摇动支持物似乎能够获得更多的可重复结果，而且不会影响到 Caco-2 细胞单层的完整性。(较强烈的摇动可能会影响黏附性较差的细胞单层的完整性。)[45]摇动还可以减小与上皮细胞表面紧邻的“水界层(ABL)”的厚度[45]。如果 ABL 显著地影响了整个系统的阻值，就可能导致细胞渗透性被低估。这个现象最初是在对快速吸收药物转运的研究中观察到的。我们的实验室采用标准“酶联免疫吸附分析”(ELISA)所用的盘式振荡器来搅拌支持物(IKA® Shüttler MTS4)。

(4) 连接在 Evohm 电阻计上的 Endohm®组织阻值测量室(World Precision Instruments)。也可采用其他制造商生产的跨上皮电阻(TER)测量系统(Millcell 生产的 Millicell ERS)。

(5) 尖头解剖刀片。

2.3 化学药品和缓冲液

以下列举的所有培养基和添加剂都能从普通供应商处购买，如 Life Technologies。所有的培养基和缓冲液都需要无菌制备。

(1) 培养基：培养和扩增在培养瓶中和透性支持物上生长的细胞通常可以使用成分相同的培养基。为了降低污染的发生，用于培养两种不同细胞类型的培养基必须装在不同的瓶子中。培养 Caco-2 细胞(在培养瓶中或在透性支持物上生长的)的标准培养基的组分在表 21.3 中列出。

表 21.3 标准培养基的组分

成分	体积	储存	货号[a]
DMEM(无丙酮酸钠的高糖配方 4.5g/L)	500mL	4°C	41965-039
非必需氨基酸(MEM)	5mL	4°C	11140-035
胎牛血清(FCS)	50mL	−20°C	—[b]
青链霉素	5mL	−20°C	15140-114

[a] 除非特别提到，上述目录号指的是来自 Life Technologies 的试剂，这些试剂也可以购自其他供应商。

[b] 最佳批次的 FCS 应从几家供应商的不同批次中选取(见下文)。

在我们实验室，抗生素只用在透性支持物上生长的细胞中。细胞维持培养时则不添加抗生素，这样可以快速检测出已污染的培养物。此外，我们还要每隔一个月筛查被支原体感染的培养细胞。

为了避免 FCS 的批次差异，通过测定细胞增殖，时间依赖的 TER 变化和甘露醇渗透性，我们对多个批次的 FCS 进行了评估。接下来，我们会购买足够一年使用的最佳批次的血清。还有一种方法，其可靠性较差，就是使用成分更加限定的培养基，如无血清培养基[46]。 239

4℃下储存的培养基的使用期限是 1 个月。

(2) 无血清培养基(SFM)：无添加成分的 DMEM。

(3) 磷酸盐缓冲液(PBS)：无 Ca^{2+}、Mg^{2+}，无菌以及无酚红(Life Technologies，cat. no.14190-094)。开瓶后的 PBS，在 4℃的储存期限为 1 个月。

(4) 胰蛋白酶-EDTA 溶液(表 21.4)。

表 21.4 胰蛋白酶-EDTA 溶液的组分

成分	体积	储存	货号[a]
PBS	40mL	室温	14090-049
胰蛋白酶(10×)	5mL	−20°C	25090-028
2% EDTA-Na 溶液	5mL	室温	280549；ICN Biomedical

[a]除非特别提到，上述货号指代的原料均来自 Life Technologies，这些材料也可以从其他供应商处获得。

Caco-2 细胞与塑料表面连接紧密。因而我们使用的胰蛋白酶-EDTA 溶液(0.25%，*m/V*)浓度高于用于消化其他细胞系的推荐浓度，因为这些细胞系与塑料表面的连接力较小。对其他细胞系而言，胰酶溶液浓度可降至(0.025%，*m/V*)。胰蛋白酶-EDTA 溶液在 4℃条件下可以储存 1 个月。

(5) Hank 平衡盐溶液(HBSS)：在药物转运实验中使用最普遍的培养基是 HBSS。为了保持所需的 pH，必须将缓冲液系统添加到 HBSS 中。

HEPES 和 Mes 是获得生理 pH(pH7.4)和弱酸性 pH(pH6.0~6.5)最常用的缓冲液。 240

1000mL，pH7.4 HBSS 的制备见表 21.5。

如果制备 1000mL pH 为 6.0 的 HBSS，用 10mmol/L Mes (1.95g) (Sigma M-8652)代换 HEPES。室温下避光保存 HBSS，可稳定存放 1 个月。

表 21.5 HBSS 成分表[a]

成分	含量	储存	供应商	货号
不含酚红的 Hank 平衡盐溶液预混合物		4°C	Life Technologies	11201-019
$NaHCO_3$	0.35g	室温	Life Technologies	066-01810
HEPES	5.96g(25mmol/L)	室温	Sigma	H-9136

[a]将 Hank 平衡盐溶液预混合物、$NaHCO_3$ 和 HEPES 加置 1000mL 的空瓶中。
加入 500mL 超纯水(如 Millipore)。
用磁力棒搅拌，使其中的成分完全溶解，将超纯水添至接近 1000mL(以便于 pH 的调解)。
滴加 NaOH(1mol/L)将 pH 调整到 7.4。
加超纯水至 1000mL。
用顶盖式滤器(0.22μm，Nunc)过滤，这样可以将污染的风险降至最小，并且延长了培养基的储存期限。

(6) 人工基质(Sigma 或 Becton Dickinson)或 EHS(Promega)。

(7) 台盼蓝。

(8) PBS 配制的 3% 多聚甲醛。

(9) PBS 配制的 0.1% Triton X-100。

(10) 硫氰酸-鬼笔环肽(分子探针)：1∶150，用 PBS 配制。

(11) PBS 配制的 50% 的甘油。

(12) PBS 配制的 0.2% Triton X-100。

(13) Z0-1 抗体(Zymed, cat. no.61-7300)。

(14) 荧光素异硫氰酸盐(FITC)标记的抗兔 IgG(Amersham, N1034)。

(15) 显微镜用载玻片和盖玻片。

(16) RNeasy 小试剂盒(Qiagen)。

(17) 用于蛋白质提取的裂解缓冲液：50mmol/L Tris-HCl, pH7. 4，10mmol/L EDTA, 1% SDS。添加足量的蛋白酶抑制剂混合物(Roche Diagnostics)。

(18) 双金鸡纳酸(BCA)分析(Pierce)。

241

2.4 药物

推荐使用药物的易溶解盐。从 Sigma 可以购买到多种注册药物。注册或试验用药物也能从各自的制药公司获得。药物的纯度必须为分析纯。因为杂质可能会损害细胞，导致转运实验产生错误结果。杂质或已降解的药物也可能影响转运药物的分析。如果可以放射性标记要研究的药物，应优先选用稳定的 ^{14}C 标记，因为这个方法非常方便并能加快分析速度；如果标记后的药物具有很高的特异放射性，就可以在非常微量的情况下被检测出。检测放射性标记药物过程中会遇到药物中可能含有放射性杂质(如 ^{3}H-水)的问题，这些杂质会妨碍分析，可能使实验中存在潜在的降解问题被忽视。标记药物一般十分昂贵，只有少数已商品化。由于对放射标记药物的相关限制，大多数研究者倾向使用未标记药物。

(1) ^{14}C-甘露醇(NEN Life Science)50Ci/mol，0.1mCi/mL。

3 方法

3.1 在透性支持物上培养上皮细胞

3.1.1 接种密度

不同实验室透性支持物上的 Caco-2 细胞接种密度从 $0.5\times10^5/cm^2$ 至 $5\times10^5/cm^2$ 不等。在我们实验室的细胞接种密度为 4.4×10^5 个/cm^2。其他细胞系的最佳接种密度可以通过检测 TER 的形成，或者建议检测时间段内 ^{14}C-甘露醇渗透性以及通过显微镜检来确定。低接种密度比高接种密度形成融合单层所需的培养时间更长，敏感细胞系可能在这期间去分化或从支持物上脱离。另一方面，过高的接种密度可能会导致一些细胞系形成细胞多层，这不符合药物转运研究的要求。

3.1.2 在透性支持物上接种细胞

这里介绍的是在透性支持物(Transwell Costar 孔径为 0.4μm，直径 12mm)上接种 Caco-2 细胞的方法。该方法也可用于其他上皮细胞系。Caco-2 细胞可与未包被的支持物直接黏附，其他细胞系只能黏附在基质包被的支持物上。生长于透性支持物上的上皮细胞单层如图 21.1 所示。如果使用基质包被的载体，应将载体提前包被好，使用前无需浸湿。浸湿支持物的方法如下：将 0.1mL 培养液添加到支持物顶部，1.5mL 培养液添加到支持物底部，将载体放在培养箱中孵育 30min(或直到细胞悬浮液准备好)。

242

(1) 移走培养液，用胰蛋白酶收集 Caco-2 细胞。

(2) 用冰预冷的 PBS 清洗细胞 1 次。

(3) 向一个($75cm^2$)培养瓶中添加 5mL 胰蛋白酶-EDTA。

(4) 轻微摇动培养瓶，然后倒掉大部分胰蛋白酶-EDTA，仅留下足够覆盖表面的液体量。

(5) 将培养瓶置于 37℃，消化时间为分离细胞所需要的最短时间。

(6) 将含有 FCS 的培养液添加到已经分离的细胞中，以抑制胰蛋白酶活力[见注意事项(1)]。对于生长面积为 $75cm^2$ 的培养瓶，10mL 培养液足以抑制胰蛋白酶活性。

(7) 计算细胞数量[见注意事项(2)]。

(8) 在 200~400*g* 情况下(转头半径 16cm，转速 1100~1500r/min)离心 5min，将细胞离心成团，弃掉含胰蛋白酶的培养液。

(9) 用新鲜培养液小心地重新悬浮细胞，细胞浓度为 1×10^6 个/mL。

(10) 在透性支持物顶部添加 0.5mL 的细胞悬浮液[见注意事项(3)]。

(11) 将支持物置于 CO_2 培养箱中培养 5h，移去培养液，加入 0.6mL 新鲜培养液。

(12) 每隔一天换液一次，连续培养 21d，得到适用于药物转运研究的完全分化的细胞单层[见注意事项(6)]。

3.1.3 用人工基质包被透性支持物

用细胞外基质包被支持物能提高上皮细胞系对透性支持物的黏着力。通常使用的基质蛋白是各种类型的胶原蛋白：Engelbreth-Holm-Swarm 肉瘤源的基质混合物，市场上出售的人工基质(matrigel)和 EHS 等商品。人工基质除了能提高细胞的附着力，还可能改善细胞的形态，促进细胞分化。

以下是用 $15\mu g/cm^2$ 的人工基质包被透性支持物(直径为 12mm)的程序。

(1) 从储存液分装足够一批细胞单层生长的人工基质，保存在无菌瓶中。分装时，使用预冷的移液管，操作在冰块上进行，使基质保持冷冻，以避免反复冻融人工基质。

(2) 在冰块上溶解分装的人工基质。注意事项：融化速度太快可能导致基质组分沉淀。预冷的 SFM 置于冰块上。使用预冷的移液管移液。

(3) 对每一个支持物，将 16.95μg 人工基质用预冷的 SFM 稀释至 250μL。

243

(4) 用第(3)步所用液量乘以载体总数来计算液体总体积，操作中需增加占总体积 10%的液体来弥补移液过程中的损失。

(5) 将人工基质添加到 SFM 中，充分混合。混合液置于冰块上。

(6) 向每一个载体添加 250μL 人工基质混合液。

(7) 将载体在 37℃孵育 2h，便于人工基质附着到表面。如果包被的载体不是立即使用，则可在 4℃下保存 24h，但是不要让载体干燥。

(8) 包被的载体即可使用。注意：必须在接种细胞前移走残留的包被液。

3.2 上皮细胞单层的特性

如果对可用细胞系不了解或知之甚少，必须对细胞单层的完整性进行检查，检查的内容包括 TER 和甘露醇渗透性随时间的改变以及对细胞单层的显微镜检。此外，细胞单层的特异性特征需通过表达、定位和功能进行鉴定(见 3.2.5)。为了保证转运实验结果的可重复性，研究者需对每一组细胞单层进行常规检查。每一次转运实验前，都应通过 TER 检测法(见 3.2.1)或 ^{14}C-甘露醇渗透性检测法(见 3.2.2)对所选细胞单层进行常规检查。

3.2.1 通过 TER 法评价 Caco-2 细胞单层

TER 检测生长于透性支持物上的细胞单层能够提供跨细胞离子流电阻的信息。与流经细胞周围空间紧密连接的离子流相比，穿过细胞膜的离子电流很小，所以 TER 反应的是细胞间紧密连接的完整性。需要指出的是这里使用的设备仅适用于 TER 的常规检测。对于定量的电生理，我们使用它处描述的自制设备进行检测[47]。

TER 具有温度依赖性。室温下细胞层的 TER 值比 37℃时高。例如，当转运实验的温度从 37℃降至室温 22℃时，Caco-2 细胞单层的 TER 值大约增加 200Ω×cm^2。缺乏适当的温度控制可能是导致文献报道的 Caco-2 单层 TER 值不同的主要因素[48]。因此为了获得可信的 TER 值，小心地控制温度是十分重要的。TER 值的测量通常在 37℃下进行。

244

Caco-2 细胞单层的 TER 值随培养时间延长而增加，在 10~14d 后达到最大值。对于我们实验室传代 90~105 次的 Caco-2 细胞单层，通常测得的 TER 值为 200~250Ω · cm^2。根据以往报道，Caco-2 细胞的 TER 值范围为 62~1290Ω · cm^2[48]。除了对温度的控制不当，TER 值的差异可能与使用不同传代数的 Caco-2 细胞或克隆有关。例如，我们实验室 30~40 代 Caco-2 细胞的 TER 值大约为 350Ω · cm^2。TER 值的变化范围较大也可能是由于使用设备的不同而造成的[48]。

(1) 将 2.4mL HBSS 添加到 Endohm 槽中，放置在 37℃的培养箱中，直至槽内温度达到 37℃。

(2) 从透性支持物上移走细胞培养液，将支持物放在空的培养孔中。将预先加热到 37℃的 HBSS 添加顶部(0.5mL)和底侧部(1.5mL)。

(3) 进行 TER 测量前，将单层在 37℃下平衡 15~30min[见注意事项(7)]。

(4) 移走顶部 HBSS，将支持物转移到 Endohm 室，向支持物顶部添加 0.25mL 预热的 HBSS。将支持物盖好(盖上有顶部电极)。确保槽中没有气泡。

(5) 在测量前等候 30s~1min[见注意事项(8)]。

(6) 用一个空白载体重复第(1)~(5)步，获得背景值。

(7) 计算 TER，用读数器上的电阻值(减去背景值)乘以单层表面积(cm^2)，得到 Ω · cm^2 表示的 TER 值[见注意事项(9)]。

(8) 弃掉单层[见注意事项(10)]。

3.2.2　跨 Caco-2 细胞单层的甘露醇转运

评价单层完整性的另一个更可靠的方法是研究亲水性指示剂分子(如模型药物)的跨单层被动转运。这种药物的被动运输既能穿过细胞(穿细胞途径),也能穿过细胞旁的紧密连接(细胞旁途径)(图 21.2)。因为亲水性分子无法大量地分布到亲脂性细胞膜内，因此其跨单层转运仅限于细胞旁途径。随着细胞不断长满形成单层并形成功能良好的紧密连接，亲水性标记分子的转运率也随着培养时间而减至最小。检测细胞单层的细胞旁转运，最常用的亲水性标记分子是 ^{14}C-甘露醇。我们实验室培养的 21~35d 的 Caco-2 细胞单层对甘露醇的渗透力大约为 1×10^{-7}~2×10^{-7}cm/s(见 3.4)。

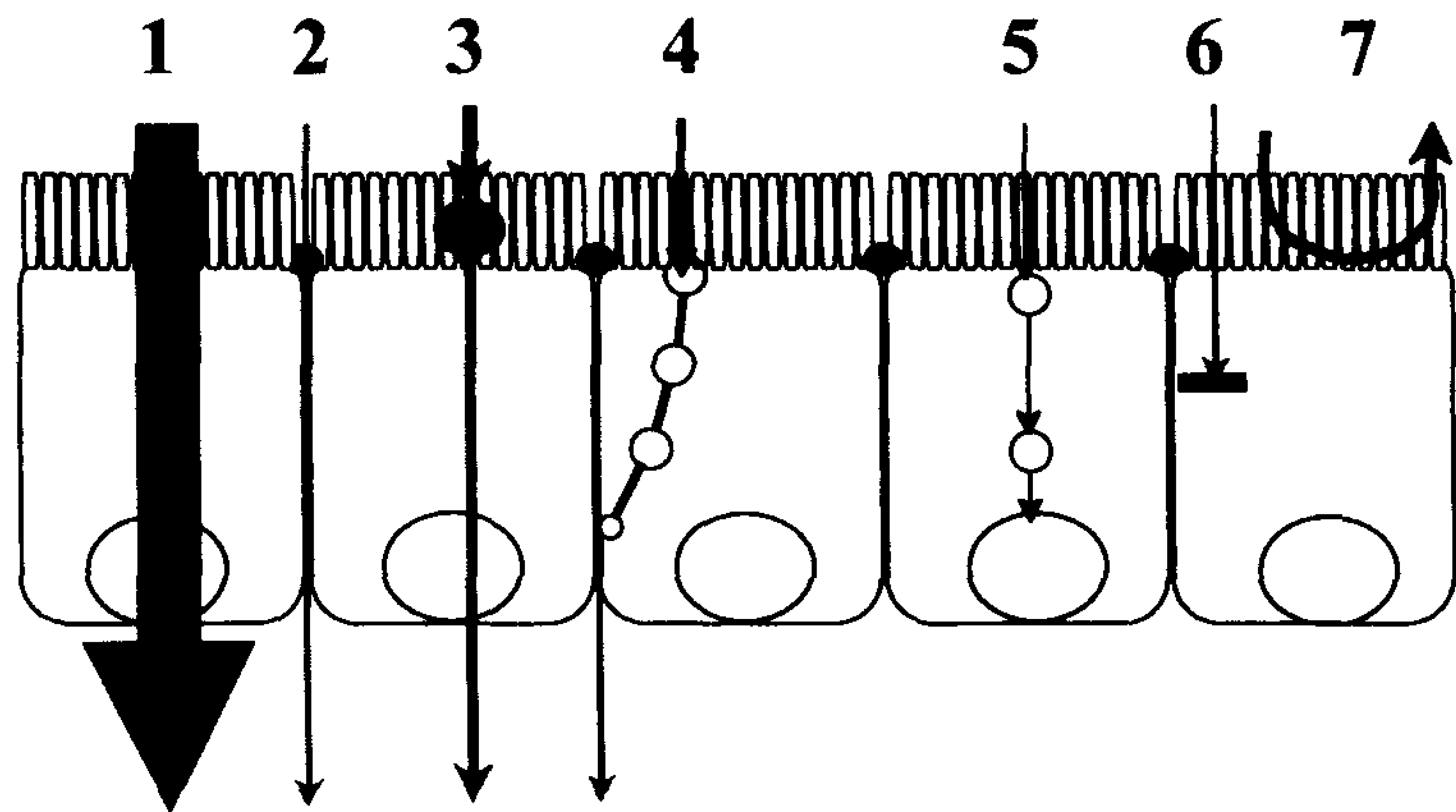


图 21.2　药物在上皮细胞单层上不同的转运路径和载体示意图
跨细胞(1)，细胞旁(2)，载体介导(3)(注意：载体可位于细胞顶部或底侧膜)，穿胞吞(4)，细胞内吞(5)，小肠代谢(6)，外流(7)(注意:分泌蛋白可位于细胞顶部或底侧膜)

转运研究与 TER 测量一样，需要严格的温度控制。因而所有的培养液都要在水浴锅中预热，此外，细胞单层应置于 37℃湿润的空气中。这可通过将载体置于有供水设施的 37℃恒温箱中实现。这个条件下实验小室中的空气湿度饱和，载体的水分蒸发也降到最低。为了避免加样时组织培养盘迅速冷却，要将其置于板式保温器上。

245

(1) 准备 ^{14}C-甘露醇溶液。按照每个透性支持物每分钟约 1×10^{6} 计数(cpm)，加至 50mL 的聚丙烯测试管中。

(2) 向试管中添加适量的预热的 HBSS，充分混合。

(3) 移走 3~4 个透性支持物上的细胞培养液，将其放于培养板的空孔中。将预热到 37℃的 HBSS 添加到顶部(0.5mL)和底侧部(1.5mL)，平衡单层 15~30min[见注意事项(7)]。

(4) 移走 HBSS，将载体转移至新孔。

(5) 添加 0.4mL 的 ^{14}C-甘露醇溶液到单层顶部，将 1.2mL 预热的 HBSS 添加到底部，在 t=0 时，从顶室取 10~50μL 的样品测定每一支持物的初始放射性[见注意事项(11)]。

(6) 将载体置于 37℃、100~500r/min 盘式摇床上培养[见注意事项(12)]。

(7) 每隔 20min 或 30min 从底侧部中取 600μL 样品，取样的总时间为 120~360min[见注意事项(13)]，用新鲜预热的 HBSS 替换移走的每一样品量。

(8) 最后一次取样后，立刻从顶室取出 10~50μL 液体，测定顶部溶液的终浓度[见注意事项(11)]。

(9) 用液体闪烁计数器测量样品的放射性。

(10) 计算细胞单层的甘露醇渗透系数(见 3.4)。

246 3.2.3 使用若丹明-蕈毒素(Rhodamine-Phalloidin)研究膜的完整性

镜检是研究细胞形态和细胞单层完整性的有效手段，它可用于验证单层的同源性以及培养上皮的紧密性。但是，一般的透性支持物在光学显微镜下无法直接观察，因为其较高的孔密度会散射照明光线，因此必须采用低孔密度的特殊嵌入物(如 Transwell clear 和 Falcon Cyclopore 的细胞培养装置)。但是，低的孔密度会限制组分向细胞底侧部转运，所以这种渗透装置并不适用于转运研究。

荧光显微镜是在细胞水平研究层状物完整性以及变化的有效工具。一般的荧光染料，例如，核染料和肌动蛋白结合试剂(如若丹明标记的蕈毒素)可以用于评定各种单层形成上皮的连续性和大体形态。

若丹明标记的蕈毒素的肌动蛋白染色用于间接研究紧密连接的完整性，因为肌动蛋白的分布通常(但并不总是)与紧密连接性状的变化相关[50]。

(1) 从透性支持物上移去细胞培养基。

(2) 添加 HBSS 清洗细胞。顶部加 0.5mL，底部加 1.5mL。

(3) 从透性支持物中移去 HBSS，然后向每个单层顶部的中间添加 250μL 3%多聚甲醛/PBS，室温固定 2min。

(4) 移去多聚甲醛溶液，并用 500μL PBS 清洗 2 次×10min。

(5) 移去 PBS，用 500μL 0.1%的 Triton X-100(PBS 配制)于 ELISA 平板摇床中以 60r/min 振摇，清洗细胞 1min。

(6) 重复清洗步骤 10min。

(7) 移去 Triton X-100，加入 250μL 的若丹明-蕈毒素溶液(1∶150，PBS 配制)，孵育 30min。

(8) 移去若丹明-蕈毒素溶液，用 500μL PBS 清洗 60s。

(9) 重复清洗步骤 2 次×10min。

(10) 用 50%的甘油(PBS 配制)清洗细胞 1 次，小心地用尖头解剖刀从细胞培养装置中切下单层和支持滤膜。

(11) 在显微镜玻片上用 50%的甘油(PBS 配制)包埋，封片。

(12) 在荧光显微镜下检测单层。

(13) 检测最好在染色之后立即进行。如不立即检测，单层可在 4℃避光保存 24h。

247 3.2.4 ZO-1 抗体评价对单层的完整性

抗紧密连接蛋白 ZO-1 的抗体提供了一种研究上皮细胞单层紧密连接的更特异的工具。适合的 ZO-1 抗体有兔多克隆抗体(Zymed, cat. no. 61-7300)和鼠单克隆抗体(Zymed, cat. no. 33-9100)。

这一方法也用于其他紧密连接相关蛋白质的染色，如 Occludin，适合 Occludin 抗体

有多克隆抗体(Zymed, cat. no. 71-1500)和鼠单克隆抗体(Zymed, cat. no. 33-1500)。

(1) 按 3.2.3 中步骤(1)~(6)操作。

(2) 移走 Triton X-100/PBS，按照 1：1000 比例用 Triton X-100/PBS 稀释 ZO-1 抗体并孵育 30min。

(3) 移走抗体溶液并用 500μL PBS 清洗 60s。

(4) 重复清洗步骤 2 次×10min。

(5) 150μL FITC 抗兔 Ig，用 PBS 按照 1：100 的比例稀释，避光中孵育 30min。

(6) 移走抗体溶液。

(7) 在 PBS 中清洗 30s。

(8) 在 PBS 中清洗 2 次×10min。

(9) 用 50%甘油 PBS 清洗细胞 1 次，用尖头手术刀小心地切除单层及细胞培养载体上的支持滤膜。

(10) 将滤膜用 50%的甘油(PBS 配制)包埋在显微镜玻片上，封片。

(11) 在荧光显微镜下检查单层。

(12) 最好染色后立即进行检验。否则，单层可在 4℃避光保存 24h。

3.2.5 从透性支持物上生长的上皮细胞中提取 RNA 和蛋白质

对上皮细胞系进行初步鉴定时，可能需要研究生长在滤膜上细胞单层的选择性标记物的表达情况。从生长在滤膜上的细胞中提取 RNA 和蛋白质需要一些技巧，下面我们提供了一种方法。这种方法获得的提取物可采用传统的分子生物学技术检测，如 RT-PCR 和 Western blot 进行评价。

(1) 用 HBSS 中清洗细胞单层[见注意事项(14)]，用尖头手术刀将其从细胞培养载体上切下。

(2) 将滤膜放入微型离心管中[见注意事项(15)和(16)]，立即在液氮中冷冻，并在−80℃下保存，备用。

(3) 用 RNeasy 微型试剂盒从 Caco-2 细胞滤膜中提取总 RNA[见注意事项(17)和(18)]，蛋白质的提取方法如下所述。

248

(4) 蛋白质提取时，将 600μL 裂解缓冲液加到含有 Caco-2 细胞滤膜的微型离心管中。

(5) 确保滤膜完全浸入缓冲液并充分搅拌，使裂解缓冲液能够充分冲洗滤膜。

(6) 短暂离心，沉淀管中的提取物。

(7) 用组织匀浆器搅匀提取物，15s[见注意事项(19)]。

(8) 将提取物移到新管，测量蛋白质浓度[见注意事项(20)]。

(9) 在−80℃储藏提取物，以备 Western blot 分析。

3.3 药物转运研究

跨吸收上皮的转运可以通过以下一种或几种途径进行：被动穿细胞途径、细胞旁途径、主动跨细胞途径(转运子介导)或者穿胞吞作用(图 21.2)。

在这一节，我们将介绍一种研究被动转运的方法。此外，还会介绍一种标准的研究主动转运的方法。在进行药物转运实验前，有一些重要问题需要事先考虑到。

(1) pH。在我们实验室，除非想研究质子梯度的作用(见 3.3.2)，通常转运实验中顶室和底侧室的 pH 都是 7.4。转运实验还可采用另一种条件：顶部 pH6.0~6.5(与体内小肠微环境相符)，底侧部 pH7.4。

(2) 药物的溶解度。许多药物在生理缓冲液，如 HBSS 中几乎不溶。对 Caco-2 细胞的药物转运实验而言，建议应用 0.1~1mmol/L 的快转运药物溶液和 5~10mmol/L 的慢转运药物溶液，因为这个浓度下，转运量能较容易地由传统的高压液相色谱法(HPLC)检测到(带有 UV-检测器)。在缓冲液稀释前，有必要用辅助溶剂预溶解亲水性药物。可应用的不影响 Caco-2 细胞单层完整性的辅助溶剂及浓度如下：0.1%二甲基亚砜(DMSO)或 1% (*V*/*V*)的乙醇。

(3) 塑性表面的吸收。使用放射性标记的药物时，溶解度不是个重要问题，因为可以使用低摩尔浓度(少于微摩尔)的药物用于试验。但是，最好向放射性药物溶液中添加至少 0.1mmol/L 的相应的非标记药物，目的是为了避免塑性表面的非特异性吸收。添加过量的非标记药物可使塑料表面的非特异性吸收位点饱和。转运实验后，通过药物的质量平衡计算来检测吸收。

249 (4) 取样的时间间隔。要圆满地完成实验，转运实验必须设计在接收室中的药物浓度达到系统的平衡浓度前或药物总量被完全取走前。供体浓度和受体浓度之间的差异，不应低于二者初始差异的 10%。通过完全的误差分析和对实验容错力的仔细考虑，这个限制百分比也可以放宽。达到这些关键值需要的时间有赖于药物的转运率(渗透系数)，也受到样品总量和取样频率的影响。因为 Caco-2 对不同药物的转运率可以相差 10 000 倍，取样的间隔时间也从快转运药物(如亲脂性药物)的几分钟到慢转运药物(如亲水性肽)的 1h。要科学地推测最佳取样时间间隔，应考虑到药物的物理化学特性(如它的亲脂性或氢键原子数量)或预实验结果。例如，药物亲脂能力的估测可由计算机计算获得(http://www.dayliyht.com/)。

(5) 分析方法。转运实验通常在“漏槽”条件下进行，因为该条件允许研究人员运用较简单的数学方法进行分析。“漏槽”条件的定义是接受室中药物浓度不超过供体室浓度的 10%。因此“漏槽”条件分析法进一步限制了设计药物转运实验时对时间间隔和(或)取样体积的选择。在以下的理论部分，我们提供了漏槽条件下使用的传统的数学解决方法(见 3.4.2 和 3.4.3)和更新、更常用的非漏槽条件的计算方法(见 3.4.4~3.4.8)。

(6) 药物的毒性。有几种商品化试剂盒可用于研究化合物毒性[MTT 测量细胞内脱氢酶活性(Sigma)或乳酸脱氢酶(LDH)渗漏法(Boehringer Mannheim)测量细胞膜渗透性]。我们的实验室经常用 ^{14}C-甘露醇转运实验作为工具来评价药物或药物添加剂对上皮完整性的影响。这是因为我们发现与其他的普通毒性检验，如 MTT 和 LDH 相比，^{14}C-甘露醇渗透性的变化是初始药物毒性的较敏感的指标。细胞完整性的检测可以通过比较存在或缺失药物或添加剂条件下甘露醇跨单层流量的变化实现。我们观察到如果在添加化合物的情况下甘露醇流量高于其对照单层的流量，那么化合物很可能对细胞有剂量依赖毒性，或者化合物以其他某种方式影响细胞单层的屏障特性。如果一种化合物对细胞有毒性，研究人员应尽量降低化合物浓度，直至甘露醇渗透性与其对照单层的渗透力相符。

3.3.1 药物被动运输

250

被动运输是由单层上的浓度梯度驱动的。例如，在供体室和受体室之间的浓度差异。被动运输具有典型的非饱和动力学特征，它不能被结构类似物抑制，不需要代谢能量。以下是我们用于检测转运是否为被动运输的常用实验：① 测定药物从顶部到底侧方向和从侧底部到顶部的渗透系数。被动运输的渗透系数不依赖于转运方向。② 测定不同药物浓度间隔的渗透系数(如 10^{-6}~10^{-3}mmol/L)。渗透系数应不依赖于浓度。

下面，我们介绍一种 Caco-2 通过被动运输方式吸收药物的渗透性测定方法。

(1) 用 HBSS 溶解[见注意事项(21)]所需的一定剂量药物，制备药液。确保药物被完全溶解。用 0.22μm 滤膜及塑料注射器过滤液体，无菌药液储存在检测管[见注意事项(22)]。如果使用放射性标记的药物，要将所需数量的药物移到一个检测管中并且在添加过滤后的未标记药物前蒸发溶剂[见注意事项(23)]。溶液水浴加热到 37℃。

(2) 将所需量的 HBSS 预热到 37℃。

(3) 从 3~6 个透性支持物上移去细胞培养液，将其置于空培养孔中。把预热到 37℃ 的 HBSS 添加到顶部(0.5mL)及底部(1.5mL)。孵育单层 15~30min[见注意事项(7)]。

(4) 转移载体至新孔。顶室添加 0.4mL 的药液，底室添加 1.2mL HBSS。在 t=0 时，从顶室取样 10~50μL，用于测定每一个渗透支持物的初始供体浓度[见注意事项(11)]。

(5) 载体放在 100~500r/min 培养箱(37℃)中的盘式摇床上[见注意事项(12)]。

(6) 3~60min 后，从底侧室取样 200~800μL。用新鲜的预热 HBSS 替补每一个抽取样品的体积。

(7) 重复步骤(6)至少 4 次，以达到可靠的统计结果[见注意事项(13)]。

(8) 在最后一次取样后，立刻从顶室抽取 10~50μL，以测定每一透性支持物上的终供体浓度。

(9) 用 HPLC 测定样品浓度，或者用液体闪烁计数器测定样品的放射性。

(10) 计算跨细胞单层药物的渗透系数(见 3.4)。

只要实验是在漏槽条件下进行的，跨 Caco-2 细胞单层的被动转运的药物转运累积量应随着时间推移而线性增加。然而，有时我们可能观察到的偏离的线性趋势(图 21.3)。 251 以下列举了在非线性转运时可能观测到的 4 种情况，并给出合理的解释：① 在第一次取样间隔期间，被转运药物量较少。这可能是由于实验开始时温度控制较差或者药物分步进入细胞单层是个限速步骤(图 21.3A)。② 在第一次取样间隔期间，被转运药物较多。该情况在放射性药物转运时偶尔可见。原因可能是放射性标记的低分子质量的杂质(如 ^{3}H-水)存在于药液中并以高于药物的速率被转运。另一个原因可能是由于向细胞单层加药的动作比较粗暴造成的(图 21.3B)。③ 转运率随着时间变化而增加。造成这种现象的原因是细胞单层随着时间的变化完整性降低。完整性降低的起因或是药物对细胞的毒性，或是在转运过程中由于污染导致细胞单层活力降低。温度控制较差造成温度随着时间变化而增加，也可能导致这种观察结果(图 21.3C)。④ 转运率随着时间变化而降低。这种 252 现象最可能的解释是渗透条件超标太多，供体室和受体室之间浓度梯度减小。然而，正如在论述原理的章节中提到的(见 3.4.4~3.4.8)，这个问题可通过使用一个较常用的方程来克服，因为这个方程可用于计算非漏槽条件下的渗透力。

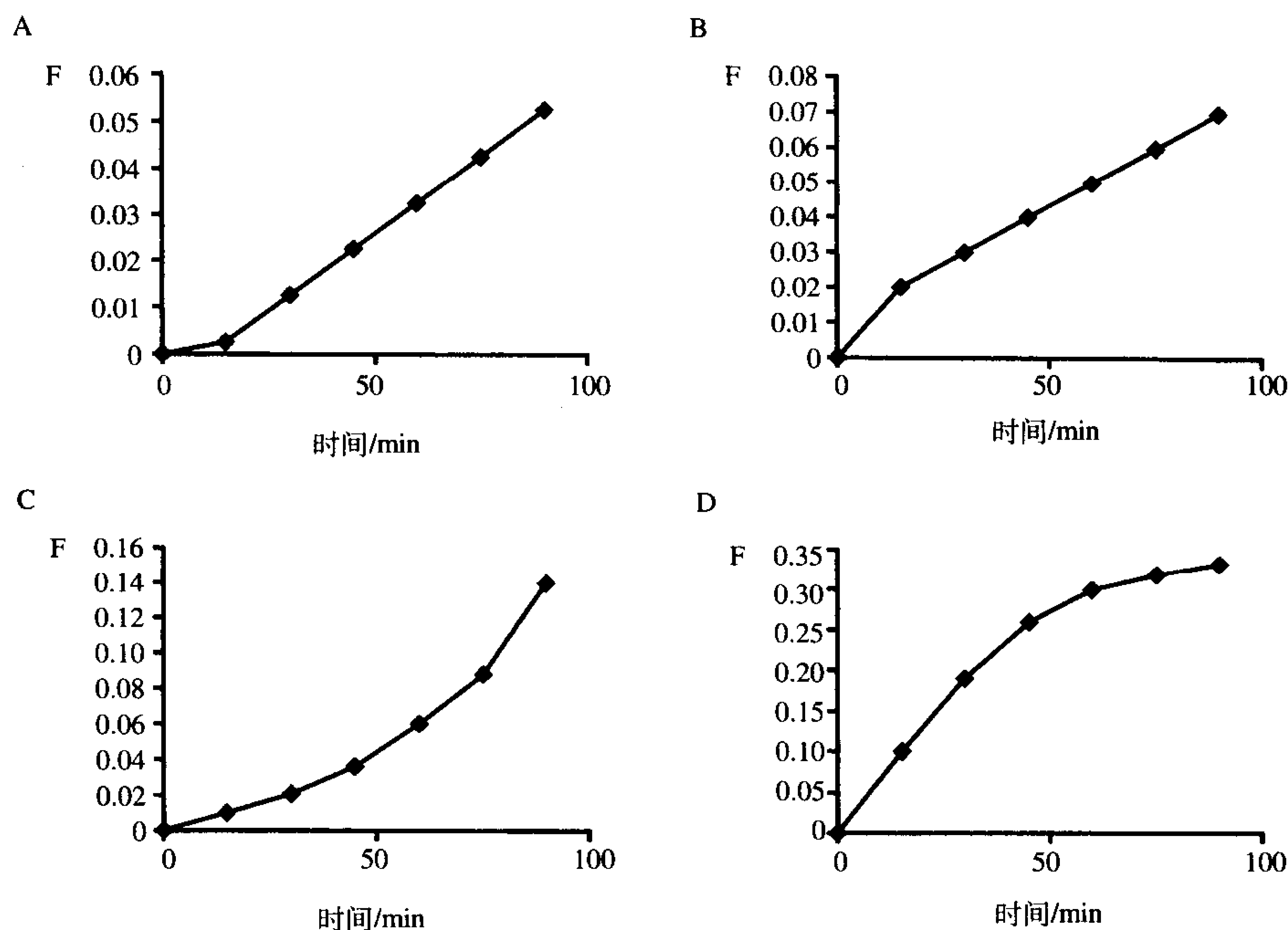


图 21.3 在上皮细胞单层药物转运实验中，以不同形式偏离的线性"转运累积部分"(F)(详见上文)

3.3.2 主动转运

与被动转运相比，主动转运是在缺乏外来驱动力(浓度梯度)的条件下发生的。主动转运过程是由位于细胞顶部或底侧部的转运子蛋白介导的。主动转运过程显示了饱和动力学特征，它具有底物特异性，能逆浓度梯度发挥作用，过程需要能量。由于多种因素影响，检测上皮细胞单层的主动转运过程十分复杂。这些影响因素包括：① 过程可能涉及位于细胞顶部和(或)底侧部膜上的多个转运子，此外，被动穿细胞或细胞旁扩散经常与主动过程同时发生；② 实验可能要求测定药物的胞质浓度；③ 不是总能找到转运子介导的转运过程的特异抑制剂。所以分化完全的上皮细胞单层，例如，Caco-2 主要用于研究转运蛋白在不同化合物转运中的"主要"作用。尽管如此，研究转运子的"主要"作用仍然大有用处，这是因为 Caco-2 细胞存在几种已知的转运子和外流系统，当上皮细胞系表达生理水平的目的转运子时，对分化上皮细胞单层的研究结果可能会反映其在体内的状态。并且，一旦发现了显著的转运机制，就可以优先在内源性转运子或分泌系统表达水平低的上皮表达系统(如 LLC PK_1、MDCK 细胞)中进行追踪研究(表 21.1)。

有几种方法能对主动转运的功能性特征进行研究。在此提供一些较直接的实验。

(1) 测定药物从顶部向侧底部方向及从侧底向顶部方向转运的渗透系数。渗透系数与转运方向有关。

(2) 测定不同浓度间隔(10^{-6}~10^{-3}mmol/L)的渗透系数。渗透系数应是可饱和的，即转运率与浓度相关。

(3) 存在和缺乏转运蛋白抑制因子的情况下，测定药物的渗透系数。转运蛋白的已知底物或受试药物的结构类似物可用作竞争性抑制剂。

253

(4) 于低温 4℃下测定药物的渗透系数，低温能极度抑制任何能量依赖型的主动转运过程。

(5) pH 依赖性。一些耦合质子型的转运子需要微酸性 pH 以维持细胞活力。例如，研究耦合质子型多肽转运子 PepT1 的功能时，必须在顶部使用 pH 大约为 6.0 的酸性环境才能获得明显的协同转运。

除以上实验外，还可以进行其他主动转运实验。例如，通过用胆碱替换钠和添加哇巴因(oubain)来抑制 Na^+/K^+-ATPase。另一减少主动转运的实验是通过添加叠氮钠和 2-脱氧葡萄糖抑制细胞新陈代谢。然而，这些方法并不总合适，根据我们的经验，抑制 Na^+/K^+-ATPase 可能只对转运作用产生很小的抑制作用，并且代谢的抑制作用对单层完整性的影响具有时间依赖性。

有效利用特殊抑制因子和底物，大大方便了采用上皮细胞单层进行的主动转运研究。不幸的是，一种抑制因子特异地对应一种转运蛋白的情况并不普遍。而且，随着各种转运子和外流蛋白家族新成员的不断发现，其数量的不断增加，以前被认为具有特异性作用的几种抑制剂其实可以与几个家族成员相互作用[51]。例如，经全面研究过的外流蛋白 P-糖蛋白(P-gp)的情况就非常复杂，这是因为发现在 P-gp 与药物代谢酶——细胞色素 P-450 3A4(和 3A5)之间存在共同作用的底物[52]。由于主动转运这个研究领域正在快速发展，并随着人类基因组计划的实施而进一步加速，所以我们认为或多或少地推荐使用各种转运和分泌系统的特异抑制剂和底物是没有意义的。相反，我们会向读者推荐关于转运系统研究的最新著作。我们还注意到传统底物和抑制剂，例如，对多肽转运 PepT1 作用的甘氨酰肌氨酸和对分泌蛋白 P-gp 作用的 Verapamil(抗心率失常药)，一般可被放射标记，这有利于抑制性实验的分析。

下面，我们介绍一种用于初步研究 Caco-2 上皮细胞主动运输的方法。建议添加浓度低但确定的(如 1μm)的放射性标记药物，目的是避免转运子饱和(注意：在使用如此低的浓度时，检查塑性表面对药物的吸收很必要)。

254

(1) 执行 3.3.1 中的全部步骤。

(2) 执行 3.3.1 中的全部步骤，但是向底侧室添加药物。

(3) 从顶部接收室中取样(50~100μL)，用新鲜的 HBSS 替补顶室中被取出的样品体积。

(4) 计算药物透过细胞单层的渗透系数(见 3.4)。

(5) 如果观测到两个方向的流速差异明显，则重复以上实验，添加非标记药物(如浓度为 10^{-6}~10^{-3}mol/L)，目的是检查流速是否具有浓度依赖性。

(6) 如果转运子有抑制剂，将之同时添加到顶室和底侧室，以便在实验期间维持固定水平的抑制剂浓度[见注意事项(27)]。

(7) 如果观测到两个方向上的流速差异不明显，那么转运可能是被动的，或者目前的实验条件下，转运子的表达和(或)功能状态不是最佳的。这种情况下，应慎重研究原因，例如，调查转运子是否依赖于质子梯度。质子梯度可以通过顶部用 pH6.0 的 HBSS，底侧部用 pH7.4 的 HBSS 的方法获得。

3.4 计算

用Caco-2 细胞进行药物被动渗透的研究是许多学术性和商业性实验室的日常工作。正如上面所总结的(见 3.3)，实验一般在漏槽条件下进行，目的是避免由于受体室中大量化合物的反向扩散造成的结果偏差。如我们所示，对漏槽条件的要求并不是绝对的，因为应用一种常用的数学表达式就能计算出非漏槽条件下的可靠的渗透系数。这种常用的数学方法优点是可以较少对实验设计的依赖，缺点是由于数学表达式比较复杂，因此应用较少。

3.4.1 基础方程的物理背景和偏差

步骤 3.3.1 描述了药物的被动渗透实验，其中包括上皮细胞单层对不同药物的屏障特性研究。对于我们的实验来说，细胞单层屏障能分离供体溶液与受体溶液。

例如，上皮屏障存在时，底物在介质，如上皮屏障上的扩散流依赖于物质浓度梯度和底物在介质上的扩散系数。屏障处的浓度概况和浓度梯度依赖于屏障的形态和化学组成。上皮屏障的形态复杂，化学组成均一。为了获得屏障的特征性性状以及测量反映出的概况，我们将试验屏障作为一种化学同一性平板结构来考虑。试验对屏障的检测结果也认为是板状的，均一的屏障等同物。

255

简化后，屏障处流量和浓度之间的关系可由 Fick 第一定理来表达[56]:

$$J=D\times[\mathrm{d}\,C(x)]/\,\mathrm{d}x \qquad \text{[方程 21.1]}$$

式中，J 表示来自屏障供体方向的流量；x 表示供体室两侧之间的距离；$C(x)$表示屏障中 x 位点的屏障内药物浓度。

如果用 C_R 表示受体浓度，C_D 表示供体浓度，则屏障中的浓度在供体侧等于 $K\times C_D$，在受体侧等于 $K\times C_R$，K 是屏障中的培养液在液态供体和受体溶液之间的扩散系数，梯度($\mathrm{d}C/\mathrm{d}x$)等于 $K\times(C_R-C_D)/h$，这里 h 是屏障的厚度。这样流量就等于受体侧底物显现率除以屏障横切面积(A)。因而：

$$J=\frac{\mathrm{d}M_R}{\mathrm{d}t}\times\frac{1}{A}=-D\times\frac{\mathrm{d}C}{\mathrm{d}x}=-K\times D\times\frac{C_R-C_D}{h}\Rightarrow$$
$$\frac{\mathrm{d}M_R(t)}{\mathrm{d}t}=\frac{K\times D}{h}\times A\times(C_D-C_R) \qquad \text{[方程 21.2]}$$

式中，M_R 表示受体室中物质的量；$K\times D/h$ 数值习惯上被称为渗透系数(P)，反映了物质穿过屏障的速度(图 21.4)。因为 K 和 D 依赖于底物和屏障的化学特性，除了屏障的厚度外，渗透系数也依赖于物质和屏障的化学特性。

在大多数类型的药物转运实验中，特别是此处讨论的转运实验类型，C_D、C_R、和 M_R 将随时间变化。当强调时间依赖性且引入渗透系数时，方程 21.2 可写成：

$$\frac{\mathrm{d}M_R(t)}{\mathrm{d}t}=P\times A\times[C_D(t)-C_R(t)] \qquad \text{[方程 21.3]}$$

该方程式是变量 $C_D(t)$、$C_R(t)$和 $M_R(t)$的微分方程式。

根据实验条件，可以对方程 21.3 做不同变换用于分析渗透系数(见下文)。

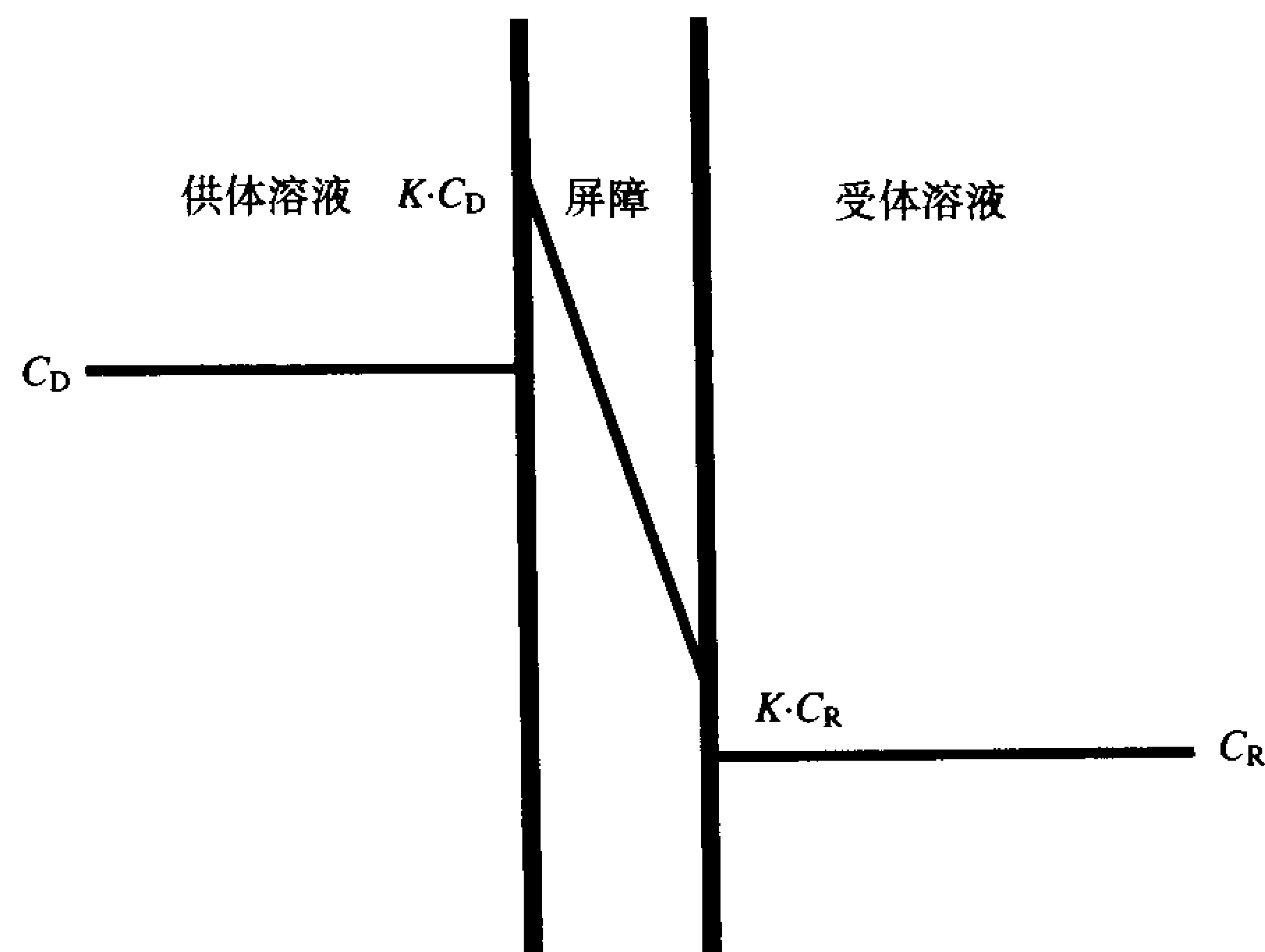


图 21.4 在供体溶液-屏障-受体溶液系统中的浓度概况图示

浓度在屏障与液相界面之间的跳跃性变化是由屏障与液相之间扩散系数引起的。

在供体和受体溶液中浓度各自相对恒定，这是由于搅拌溶液的结果

3.4.2 受体浓度趋近零时的分析(漏槽条件) 256

当转运率很低时，无论供体还是受体浓度随着时间的改变都变化不大。在这一条件下,供体和受体浓度能在方程 21.3 的右边接近恒定。这是方程 21.3 传统的最简单的解法。在这一分析中，浓度水平为初始浓度，因而受体浓度置于零。

由于认为受体浓度是零，“漏槽条件”这一术语习惯性地用于此类实验。因为按照惯例，只有受体最大浓度低于供体浓度的 10%时，才被认为是漏槽条件。

有了这些近似值，方程 21.3 变为：

$$\frac{\mathrm{d}M_{\mathrm{R}}(t)}{\mathrm{d}t} = P \times A \times C_{\mathrm{D0}} \Rightarrow \frac{\mathrm{d}M_{\mathrm{R}}(t)}{\mathrm{d}t} \times \frac{1}{A \times C_{\mathrm{D0}}} = P \qquad \text{[方程 21.4]}$$

整理得[57]：

$$\frac{M_{\mathrm{R}}(t)}{C_{\mathrm{D0}}} = P \times A \times t + const \qquad \text{[方程 21.5]}$$

由于 M_R 的初始值为零(时间为零时)，则 M_R 值恒为零或忽略不计。

如考虑 C_D 变化，可以进一步完善分析。每次取样(i)时的供体浓度[$C_D(t_i)$]可以通过前一次取样(i-1)时的供体浓度以及两次取样间隔内进入受体室的量计算出来。 257

$$C_{\mathrm{D}}(t) = C_{\mathrm{D}}(t_{i-1}) - \frac{[C_{\mathrm{R}}(t) - f \times C_{\mathrm{R}}(t_{i-1})] \times V_{\mathrm{R}}}{V_{\mathrm{D}}} \qquad \text{[方程 21.6]}$$

式中，V_R 表示受体室体积；V_D 表示供体室体积；f=1−V_S/V_R 表示样品替代稀释因子；V_S 表示样品体积，两次取样的时间间隔 C_D 是恒定值，其值等于取样开始时与结束时 C_D 的平均值。结合方程 21.4 就得出：

$$\frac{1}{A}\times\sum_{k=1}^{i}\frac{M_{Rk}}{[C_D(t_{k-1})+C_D(t_k)]/2}=\frac{1}{A}\times\sum_{k=1}^{i}\frac{[C_R(t_k)-f\times C_R(t_{k-1})]\times V_R}{[C_D(t_{k-1})+C_D(t_k)]/2}=P\times t_i \qquad \text{[方程 21.7]}$$

式中，t_i 表示第 i 次取样的时间点；t_k 表示 k 次取样的时间点；M_{Rk} 表示时间间隔为 k 时第 i 次取样时穿过屏障的数量；$C_R(t_k)$表示第 k 次取样时的测量浓度；P 由方程 21.7 的拟合直线斜率决定。线性曲拟的方法见 Excel，软件还同时提供斜率函数和截距(图 21.5 和图 21.6)。

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	A (cm²)		t (s)	Cr exp (uM)	Cr rel	cumulative fraction transported (cm)	theor	diff^2 Cr	Cd (uM)
2					=D2/I2	=0	=P*C2+B$13	=(G2-F2)^2	=Cd0
3	Vd (cm³)				=D3/I3	=(D3-D2*f)/(I3+I2)*2*Vr/A+F2	=P*C3+B$13	=(G3-F3)^2	=I2-(D3-D2*f)*Vr/Vd
4	Vr (cm³)				=D4/I4	=(D4-D3*f)/(I4+I3)*2*Vr/A+F3	=P*C4+B$13	=(G4-F4)^2	=I3-(D4-D3*f)*Vr/Vd
5	Vs (cm³)				=D5/I5	=(D5-D4*f)/(I5+I4)*2*Vr/A+F4	=P*C5+B$13	=(G5-F5)^2	=I4-(D5-D4*f)*Vr/Vd
6	f	=1-Vs/Vr			=D6/I6	=(D6-D5*f)/(I6+I5)*2*Vr/A+F5	=P*C6+B$13	=(G6-F6)^2	=I5-(D6-D5*f)*Vr/Vd
7					=D7/I7	=(D7-D6*f)/(I7+I6)*2*Vr/A+F6	=P*C7+B$13	=(G7-F7)^2	=I6-(D7-D6*f)*Vr/Vd
8	Cd0 (uM)				=D8/I8	=(D8-D7*f)/(I8+I7)*2*Vr/A+F7	=P*C8+B$13	=(G8-F8)^2	=I7-(D8-D7*f)*Vr/Vd
9									
10									
11									
12	P (cm/s)	=SLOPE(F2:F8,C2:C8)							
13	intercept	=INTERCEPT(F2:F8,C2:C8)							
14	SSE	=SUM(H2:H8)							
15									
16									
17									
18									

图 21.5　在漏槽条件下通过 6 次已知受体浓度确定的渗透系数方程式的 Excel 表格示例

横切面积值(A)，供体和受体溶液体积(V_d 和 V_r)，样品体积(V_s)以及供体初始浓度(C_{do})需要分别填入 A 列提示的相应B 列中。实验测定的浓度和取样时间点分别填入 D 和 C 列。渗透系数在表 B12 格中显示。因为 B6 格、F 列、G 列和 I 列的方程式指代的是变量名称，而不是 B 列表格名称，因此涉及的表格必须给予相应的变量名称，所以 B1 格被命名为 A，B3 格为 V_d，B4 格为 V_r，B5 格为 V_S，B6 格为 f，B8 格为 C_{do} 以及 B12 格为 P。E 列显示每次取样时受体和供体浓度的比值，用于检测是否符合漏槽条件。F 列显示由实验测定的受体浓度(D 列)计算出来的转运药物累积值。G 列有根据曲拟直线推测出的转运药物累积理论值。H 列中包含转运药物累积部分的实验值与理论值的方差值。SSE 在 B14 格中列出。I 列中有通过实验测定的受体浓度(D 列)计算出来的供体浓度

方程 21.7 的左侧和中间部分可作为“转运药物的加权标准化累加量”。每个时间间隔的转运量可通过各个时间间隔的驱动力(供体浓度)平均值的倒数来计算。除以上皮细胞单层的上皮横截面积以标准化。由于“转运药物加权标准化的累加量”不便于表达，因此不完全准确的“转运累积部分”常出现在文献中，也用于本章的叙述中。

3.4.3　漏槽条件下，检测渗透系数

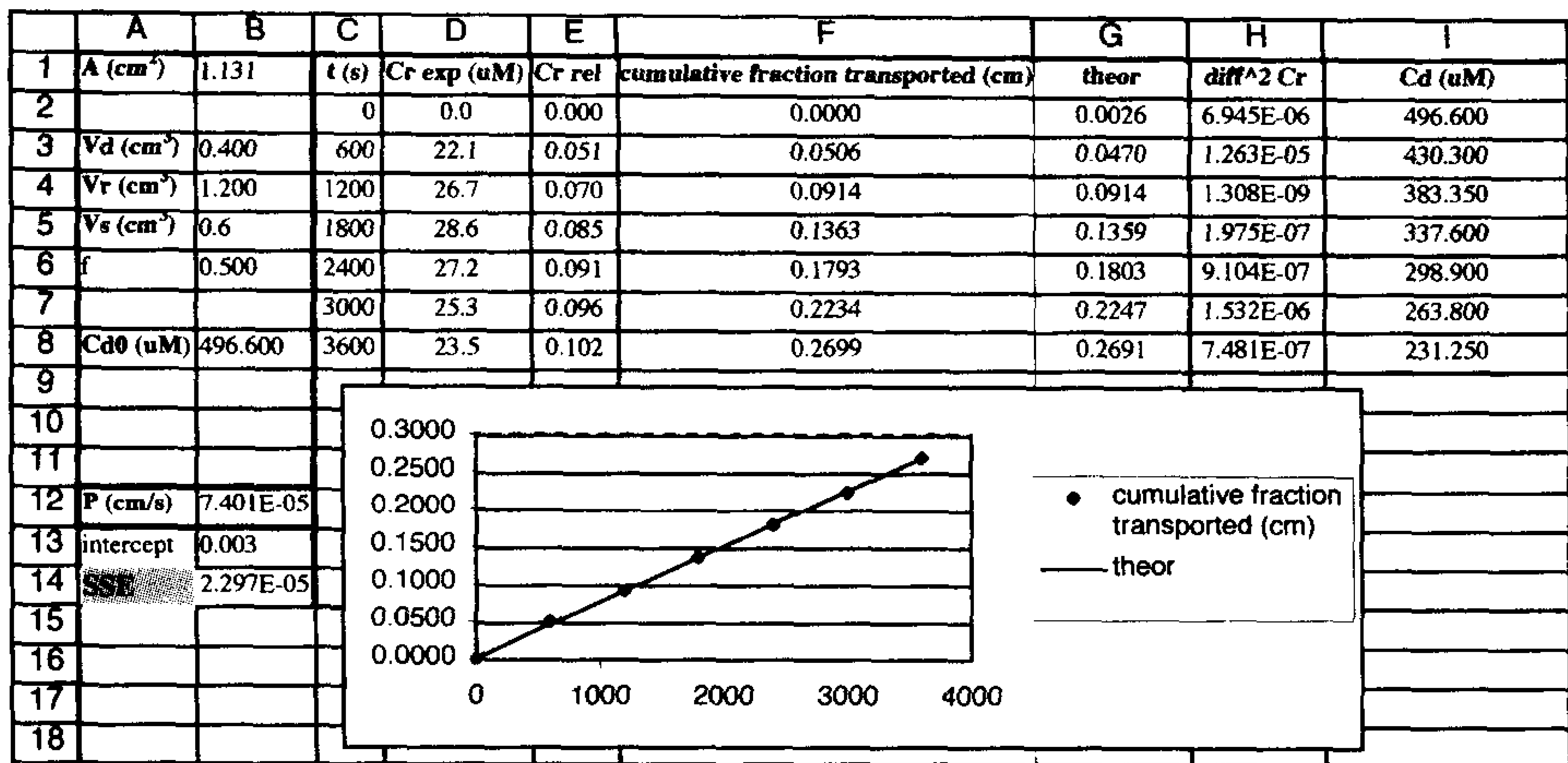
(1) 根据 3.3.1 在不同时间测量受体浓度。

(2) 根据方程 21.6 计算 C_D。

(3) 在每一个取样点，检查分析中用到的 C_R/C_D 值是否小于 0.1(漏槽条件)。

(4) 根据方程 21.7 中间部分计算每次取样时转运的累积部分。

(5) 通过线性曲拟方程 21.7 对应的吸收累积值，确定 P。



	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	A (cm²)	1.131	t (s)	Cr exp (uM)	Cr rel	cumulative fraction transported (cm)	theor	diff^2 Cr	Cd (uM)
2			0	0.0	0.000	0.0000	0.0026	6.945E-06	496.600
3	Vd (cm³)	0.400	600	22.1	0.051	0.0506	0.0470	1.263E-05	430.300
4	Vr (cm³)	1.200	1200	26.7	0.070	0.0914	0.0914	1.308E-09	383.350
5	Vs (cm³)	0.6	1800	28.6	0.085	0.1363	0.1359	1.975E-07	337.600
6	f	0.500	2400	27.2	0.091	0.1793	0.1803	9.104E-07	298.900
7			3000	25.3	0.096	0.2234	0.2247	1.532E-06	263.800
8	Cd0 (uM)	496.600	3600	23.5	0.102	0.2699	0.2691	7.481E-07	231.250
9									
10									
11									
12	P (cm/s)	7.401E-05							
13	intercept	0.003							
14	SSE	2.297E-05							
15									
16									
17									
18									

图 21.6　该图与图 21.5 相同。但是在实验数据中插入了表格，并确定了渗透系数

实验数据与图 21.8 相同。一定时间的转运药物累积部分的理论值和实验值在图上显示并添加到表格中，本图有助于理解实验值和理论值的偏离，以及线性转运累积部分

3.4.4　浓度持续变化时的分析(非渗透条件)

258

为了求解供体和受体浓度连续变化时的微分方程 21.3，方程必须被表达为单个变量的形式。较实际地把方程式用 $C_R(t)$表示。这样 $M_R(t)$和 $C_D(t)$都可表示在 $C_R(t)$中。

供体侧的药物量等于系统总量(M_{tot})与受体室药量的差值。$C_D(t)$用供体侧药量除以供体溶液体积(V_D)得到，即

259

$$C_D(t) = \frac{M_{tot} - C_R(t) \times V_R}{V_D} \qquad \text{[方程 21.8]}$$

进一步变化得：

$$\frac{dM_R(t)}{dt} = \frac{dC_R(t)}{dt} \times V_R \qquad \text{[方程 21.9]}$$

方程 21.3、21.8 和 21.9 推导出：

$$\frac{dC_R(t)}{dt} = \frac{P \times A}{V_R} \times \left(\frac{M_{tot}}{V_D} - C_R(t) \times \frac{V_R + V_D}{V_D} \right) \qquad \text{[方程 21.10]}$$

解方程 21.10 得[55, 58]：

$$C_R(t) = \left(\frac{M_{tot}}{V_D + V_R} \right) + \left(C_{R0} - \frac{M_{tot}}{V_D + V_R} \right) \times e^{-P \times A \times \left(\frac{1}{V_R} + \frac{1}{V_D} \right) \times t} \qquad \text{[方程 21.11]}$$

在这里认为初始条件 $C_R(0)=C_{R0}$。

260 方程 21.11 表示受体浓度在无干扰系统中随时间发生的变化。因为药物被不断取走，受体浓度在每次取样时后被即时稀释，因此方程 21.11 并不严格有效。

但是该方程式在每个时间间隔内仍然有效。若已知每一间隔的初始受体浓度和药物

261 总量，就能确定每一间隔的终末受体浓度。这种情况下，时间从每一间隔的开始算起，而不是从实验开始算起。

每一间隔的初始受体浓度可通过以下方程计算：

$$C_{R0,i} = C_{R,i-1}(t_{end,i-1}) \cdot f = C_{R,i-1}(t_{end,i-1}) \times (V_R - V_S)/V_R \qquad [方程 21.12]$$

式中，$C_{R0,i}$ 表示间隔 i 的初始受体浓度；$C_{R,i-1}(t_{end,i-1})$表示上一次间隔末的受体浓度；$t_{end,i-1}$ 表示上一次时间间隔开始至结束所用的时间。

每次间隔的药物总量可以从以下方程式计算：

$$M_{tot,i} = M_{tot,i-1} - M_{samp,i-1} = M_{tot,i-1} - C_{R,i-1}(t_{end,i-1}) \times V_S \qquad [方程 21.13]$$

式中，$M_{tot,i}$ 表示间隔 i 时系统中的药物总量；$M_{samp,i-1}$ 表示取样中的药物量；$M_{tot,i-1}$ 表示上一次间隔系统的药物总量。

对第一个间隔，实验中初始受体浓度用 C_{R0}(通常为零)表示，实验中药物总量用 M_{tot} 表示(当 $C_{R0}=0$ 时 $M_{tot}=C_{DO} \cdot V_D$)。

间隔的理论终末浓度用于非直线曲拟实验浓度，用以决定 P 值。曲线拟合可通过最小化残差平方和(SSE)完成：

$$SSE = \Sigma[C_{R,i,obs} - C_{R,i}(t_{end,i})]^2 \qquad [方程 21.14]$$

式中，$C_{R,i,obs}$ 表示间隔 i 末期测得的受体浓度；$C_{R,i}(t_{end,i})$是根据方程 21.11 所计算得到的相应浓度[59]。Excel 提供的求解器工具可用于最小化 SSE(图 21.7 和图 21.8)。

3.4.5 非直线曲线拟合的讨论

根据方程 21.11，C_R 的理论值依赖于 P 值。因此，对于不同的 P 值时就可以得到不同的理论浓度。将最符合实验值的理论浓度特征值拟合，此时意味着 SSE 值最小，所得的曲线被称作拟合曲线，相应的 P 值叫做拟合曲线确定的渗透系数。

可采用 Solver 工具来寻找最佳 P 值：指定需被最小化的目标函数(SSE)，选定最小化目标函数 SSE 和可改变变量(P)，最小化 SSE(图 21.9)。

使用这种方法前需猜测初始 P 值。如果是漏槽条件，那么分析实验的中间步骤，

263 就可获得初始 P 值。如果用一种药物进行多个实验，估计的初始 P 值可用于该药的所有实验。

一般地，应用数字曲拟程序会存在一个风险。因为 SSE 函数除了产生整体极小值外，还会形成几个错误的局部极小值，这时程序找到的可能会是一个局部而不是整体最小值(图 21.9)。直观观察图中相应的理论值与实验数值之间的拟合程度，就足以判断找到的 P 值是否符合相应的整体最小值。若找到的是错误的最小值，则必须重新设定 P 的初始估计值重复曲拟。在这种条件下，曲拟的过程变成了一门艺术而不是一门科学，有几种加

快 P 值寻找过程的方法。总之，只用一种方法重复寻找 P 值很麻烦。建议下一次尝试的初始估计值应为上次估计值的上下一个或两个数量级[59]。但是，我们的经验是错误的最小值问题很少出现在方程 21.11 的曲拟中。

	A	B	C	D	E	F	G
1	A (cm²)		t (s)	Cr exp (uM)	Cr theor (uM)	diff^2 Cr	Mtot (nmol)
2					=Cr0	=(D2-E2)^2	
3	Vd (cm³)				=G3/(Vr+Vd)+(Cr0-G3/(Vr+Vd))*EXP(-A*P*(1/Vd+1/Vr)*C3)	=(D3-E3)^2	=Cr0*Vr+Cd0*Vd
4	Vr (cm³)				=G4/(Vr+Vd)+(E3*f-G4/(Vr+Vd))*EXP(-A*P*(1/Vd+1/Vr)*(C4-C3))	=(D4-E4)^2	=G3-Vs*E3
5	Vs (cm³)				=G5/(Vr+Vd)+(E4*f-G5/(Vr+Vd))*EXP(-A*P*(1/Vd+1/Vr)*(C5-C4))	=(D5-E5)^2	=G4-Vs*E4
6	f	=1-Vs/Vr			=G6/(Vr+Vd)+(E5*f-G6/(Vr+Vd))*EXP(-A*P*(1/Vd+1/Vr)*(C6-C5))	=(D6-E6)^2	=G5-Vs*E5
7					=G7/(Vr+Vd)+(E6*f-G7/(Vr+Vd))*EXP(-A*P*(1/Vd+1/Vr)*(C7-C6))	=(D7-E7)^2	=G6-Vs*E6
8	Cd0 (uM)				=G8/(Vr+Vd)+(E7*f-G8/(Vr+Vd))*EXP(-A*P*(1/Vd+1/Vr)*(C8-C7))	=(D8-E8)^2	=G7-Vs*E7
9	Cr0 (uM)						
10							
11							
12	P (cm/s)						
13							
14	SSE	=SUM(F2:F8)					
15							
16							
17							
18							

图 21.7　在非渗透条件下通过 6 次测定受体浓度确定的渗透系数方程式的 Excel 表格示例

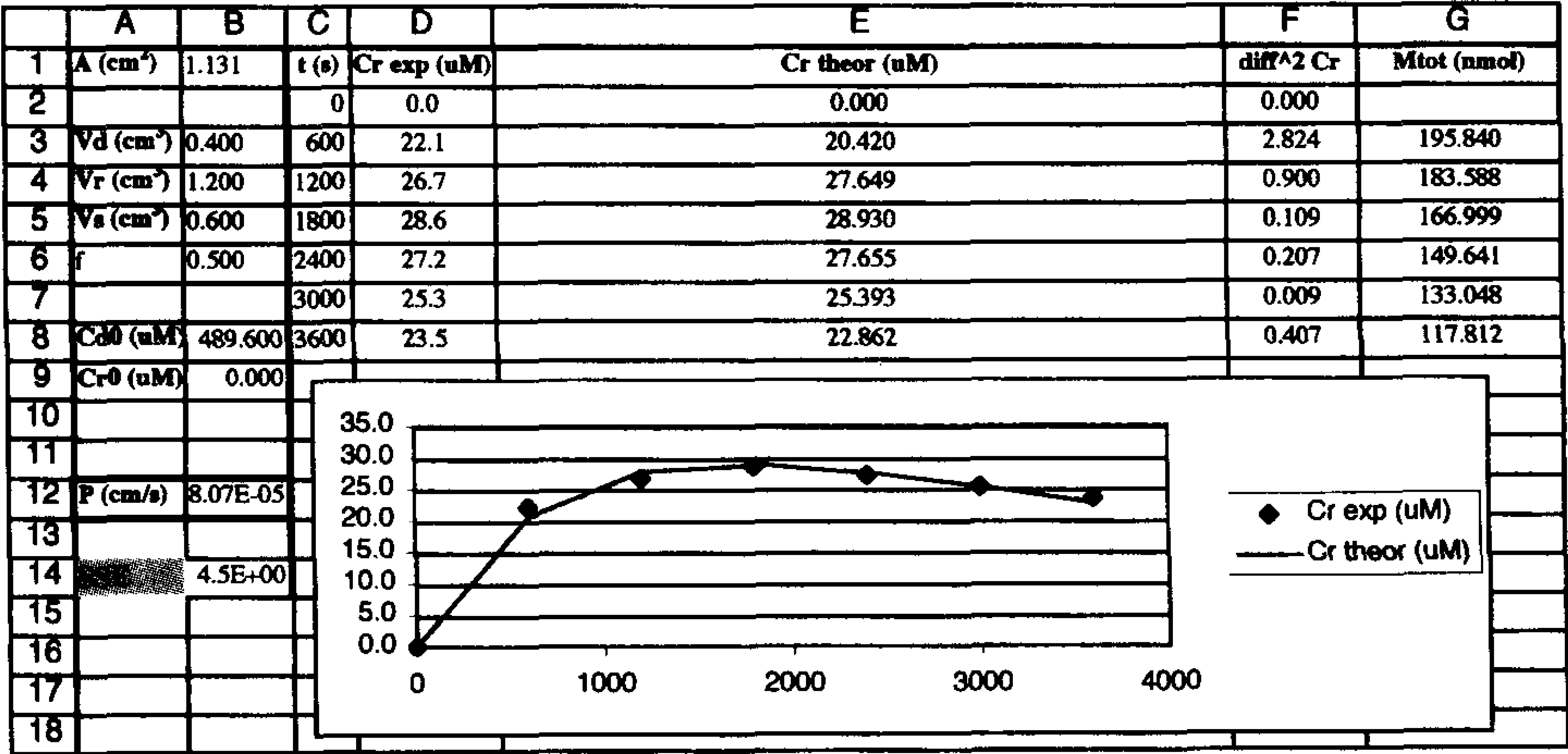
横切面积值(A)，供体和受体溶液体积(V_d、V_r)，样品体积(V_s)，供体和受体初始浓度(C_{d0}、C_{r0})必须填入 A 列所示的相应 B 列中。实验测定浓度和相应的样品取样时间点分别填入 D 和 C 列。

渗透系数的初始假设值插入 B12 格。线性曲拟方程会改变 P 值，并在同一格中记录最终确定的 P 值。

因为在 B6 格，F、G 和 I 列的方程式指代的是变量名称，而不是 B 列表格名称，因此列中涉及的表格必须给予相应的变量名称，所以 B1 格为 A，B3 格为 V_d，B4 格为 V_r，B5 格为 V_s，B6 格为 f，B8 格为 C_{d0}，B9 格为 C_{r0}，B12 格为 P。

E 列显示每次取样时受体浓度的理论值。F 列中有受体浓度的理论值与实验值的方差。SSE 在 B14 格。G 列中有通过实验测定的受体浓度(D 列)推算的小室系统的物质总量。

对曲拟步骤的求解， B14 格的数值需要被最小化。B12 是为最小化 B14 格数值设定的变化格。限制 $P \geq 0$，以减少出现错误解释的可能



	A	B	C	D	E	F	G
1	A (cm²)	1.131	t (s)	Cr exp (uM)	Cr theor (uM)	diff^2 Cr	Mtot (nmol)
2			0	0.0	0.000	0.000	
3	Vd (cm³)	0.400	600	22.1	20.420	2.824	195.840
4	Vr (cm³)	1.200	1200	26.7	27.649	0.900	183.588
5	Vs (cm³)	0.600	1800	28.6	28.930	0.109	166.999
6	f	0.500	2400	27.2	27.655	0.207	149.641
7			3000	25.3	25.393	0.009	133.048
8	Cd0 (uM)	489.600	3600	23.5	22.862	0.407	117.812
9	Cr0 (uM)	0.000					
10							
11							
12	P (cm/s)	8.07E-05					
13							
14	SSE	4.5E+00					
15							
16							
17							
18							

图 21.8　与图 21.7 中相同的 Excel 表格，但是添加了实验数据，并测定出渗透能力

实验数据与图 21.6 一样。受体浓度的理论和实验值对应于时间的点线图已经添加在表格中。

本图有助于理解实验和理论值之间的偏差

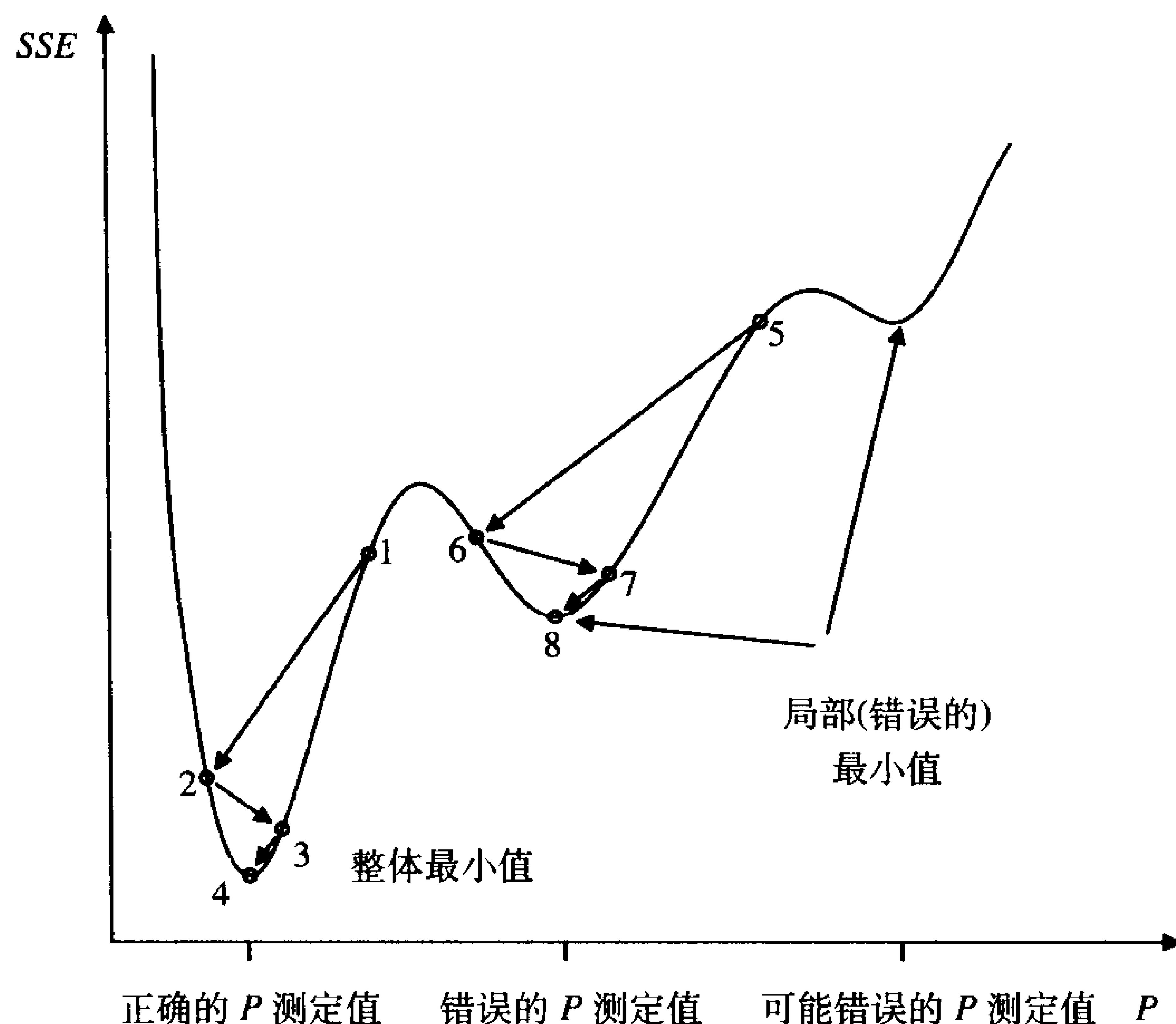


图 21.9　*SSE* 对应 *P* 特征值的示意图

点 1~4 显示从 *P* 初始估计值(点 1)到整体最小值(点 4)处正确 *P* 值的搜寻轨迹；点 5~8 显示从另一个 *P* 初始估计值(点 5)开始的搜寻，搜寻结果最终落在局部(错误的)最小值处

3.4.6　在非漏槽条件下渗透系数的确定

(1) 根据 3.3.1 在不同时间位点测定受体浓度。

(2) 根据被研究药物在居中漏槽条件的 *P* 值，寻找 *P* 的初始估计值。

(3) 根据方程 21.11 非线性曲拟实验值来确定 *P* 值。方程中应用初始浓度的时间间隔特异值和总量。

3.4.7　非线性曲拟确定渗透系数后，受体浓度的再计算

(1) 根据方程 21.11，利用药物初始量和初始受体浓度(通常为零)来确定第一次取样间隔的终末受体浓度。

(2) 根据方程 21.12 和 21.13 确定下次取样时间间隔的初始受体浓度和总量。

(3) 根据方程 21.11 确定相应取样间隔的终末受体浓度。从间隔的开始计时。下次间隔再回到第二步。

(4) 重复步骤(2)和(3)，直至最后的取样间隔被处理完毕。

(5) 利用步骤(3)所获得时间间隔的终末浓度,非线性曲拟确定 *P* 值。

3.4.8　初始缺陷的处理

264

如 3.3.1 所述，在实验刚开始的一段时间内可能存在一些缺陷。这些缺陷可能导致该时间内药物转运率偏差，而无法反映细胞单层的渗透能力。如果出现这种情况，这一段时间间隔的测量值应从渗透力检测中排除。进行漏槽条件分析时，简单的处理方法是用

剩余的实验值进行线性曲拟。

在非漏槽条件分析时，则必须进行重新计算：

(1) 初始供体和受体浓度为排除缺陷时间间隔后第一次取样的受体和供体浓度，初始受体浓度(C_{R0new})就变成

$$(C_{R0new}) = C_R(t_{exc+1}) \times f \qquad [方程 21.15]$$

式中，t_{exc+1} 表示排除该时间间隔后第一次取样时间点。

(2) 初始供体浓度(C_{D0new})必须通过实验开始时供体浓度(C_{D0})计算出来，C_{D0} 要通过转移到受体室中的药物量来调整，即

$$(C_{D0new}) = C_{D0} - \frac{C_R(t_{exc+1}) \times V_R + \sum_{i=1}^{N_{exc}} C_R(t_i) \times V_S}{V_D} \qquad [方程 21.16]$$

式中，N_{exc} 表示被排除时间间隔内的取样次数。其总和涵盖了被排除时间间隔内的所有样品。

(3) 最后，时间必须从 t_{exc+1} 开始算起。

3.4.9 两种分析方法的比较

非漏槽条件分析与假定漏槽条件的分析相比，应用更广泛，限制条件更少。对高渗透性药物来说，漏槽条件分析法要求实验时间短或者取样频繁。若实验目的是长时研究系统，或取样过程会影响实验，那么上述条件并不理想的。若最佳时间间隔(见 3. 3.3)的猜测适当，且实验的取样时间间隔不需要重新设计，则更可能采用非漏槽条件分析法而不是漏槽条件分析法。

非漏槽条件分析法建立在对微分方程 21.3 的精确求解基础上的，而渗透条件分析法是建立在近似值的基础上(图 21.10)。即使在漏槽条件下进行实验，非渗透条件分析法也可以得出与上皮细胞单层的真实渗透系数更吻合的数值。比较图 21.6 和图 21.8 的结果，可以显示两种方法确定的渗透系数之间的差异。在这一例子中，与非漏槽条件分析确定的渗透系数相比，用漏槽条件分析法确定的渗透系数被低估了 10%。 265

如上所述，漏槽条件分析法可用于获得非漏槽条件分析的非线性曲拟的初始近似值。漏槽条件分析法在发现初始实验缺陷(见 3.3.1 和 3.4.8)方面有极大的优势。在漏槽条件的实验间隔中，这些缺陷会以非线性形式出现。所以，推荐两种分析方法互补使用，但是渗透系数的最终值还要用非漏槽条件分析法确定。

尽管非漏槽条件分析法应用更广泛，但也存在实验条件的限制(见 3.3)。若受体浓度突然升高，以至于许多或全部样品浓度接近于饱和值，其后果是非渗透条件分析失败或得到一些极不可靠的数值。这些情况出现时，有必要缩短实验时间或加快取样频率。 266

3.4.10 数据分析的讨论

每次实验中，受体浓度测定值的误差，在曲拟数值时会波及到渗透系数的测定。若各个样品的偏差已知或可估，就可估计每次确定的渗透系数的标准差。但标准差的估计

很少在科学论文中报道，不这样做的原因是：生物学的差异远高于单个测定值的差异。在绝大多数情况下，这是可能的正确假设，但必须通过试验检验。标准差计算的标准方法可在曲拟领域的任何教科书中找到[59]。

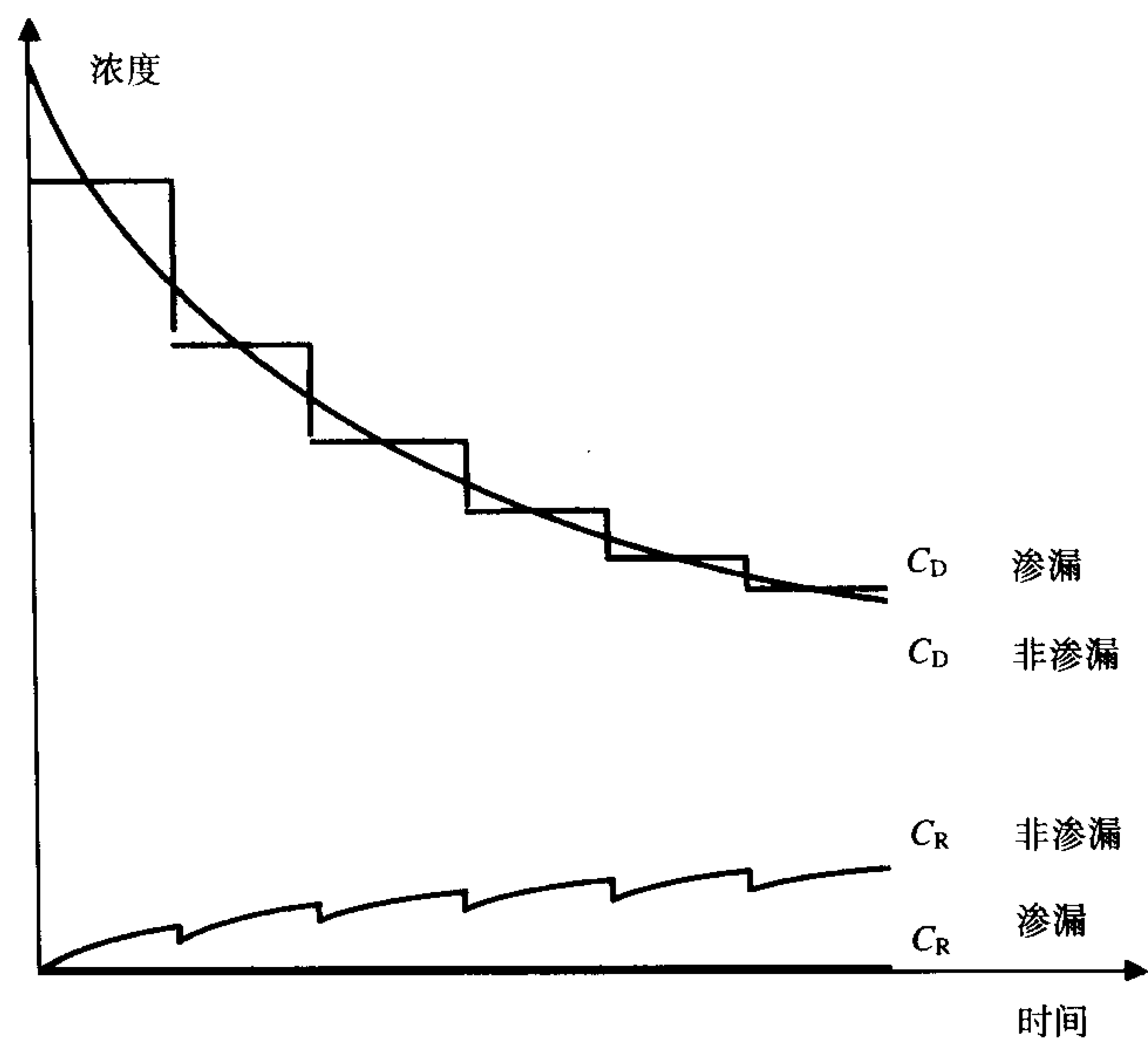


图 21.10 图中所示分别为漏槽条件和非漏槽条件分析时的受体和供体浓度

非漏槽条件受体浓度曲线出现锯齿状的原因是，当样品被同样数量的实验纯液取代时，受体浓度在取样步骤被瞬间稀释。扩散驱动力是供体和受体之间的浓度差。在漏槽条件分析时，驱动力由于误差被系统高估，将导致渗透系数的误差被系统低估

4 注意事项

(1) 血清可以使蛋白酶失活。这一步骤是必要的，否则胰蛋白酶在随后的步骤仍有活性，可能最终导致细胞死亡。

(2) 在光学显微镜下，用血细胞计数板计数细胞是最方便的办法。我们用台盼蓝染色检查受损细胞。被染色的细胞数应少于 5%。

(3) 将细胞悬液加到透性支持物上时，必须非常小心，要避免细胞接触底侧室。这可能导致在支持滤膜的对(向下)面形成单层。

(4) 除去非贴壁细胞，以防形成细胞多层。

(5) 换液时，最方便的办法是用连有真空管的细移液管(如 1mL 移液管)吸去旧液。先除去底侧部液体，后移去顶部液体以防细胞干燥。添加新鲜液体时，要先加顶部液体，再加底侧部液体。

(6) 21d 后，Caco-2 细胞单层的许多重要功能特征已经稳定，在我们的实验中，用于药物转运研究的细胞单层需要再培养 14d。

(7) 平衡步骤是必需的，为的是给予细胞适应液体变化的时间。

(8) 我们已经注意到，小室中细胞单层的 TER 随时间降低。这可能是离子在电极上的渗漏引起的，离子渗漏反过来又会影响细胞。所以，应在短而确定的间隔内测量 TER。

(9) 单层的电阻与其表面积有关。面积越大，离子流越高，电阻越小。所以，电阻乘以单层表面积即得单层细胞特异 TER。

267

(10) 由于来自电极的离子(Ag^+)渗漏可能引发毒性作用，所以用于测量 TER 的单层绝不能用于其他实验。

(11) 在 t=0 及实验结束时从供体溶液中抽取样本有利于质量平衡的计算，这样可以检测到药物的可能损失，如吸附到塑性表面。

(12) 以适当速率搅拌载体会降低紧邻细胞单层液体界面层的影响(这一点在研究快速转运药物时尤其重要)。

(13) 在药物转运实验期间，取样次数将影响测定的准确性。取样次数(4~6 次)是准确测定药物渗透系数必需的。多次取样能获得与可能的滞后时间和其他线性偏离有关的信息。然而在某些情况下，单一时间点(如 60min 后)取样就足够了[49]。

(14) TER 测量或转运分析后生长有 Caco-2 细胞的透性支持物能被进一步处理，用于转录和蛋白质表达的分析。对于以上任何一种应用，保存 3 个渗透支持物上的细胞单层就足够了(直径 12mm)。

(15) 使用 2.0mL 的直壁冷冻管，以确保组织匀浆器可以接触到样品(如配有一个 6-G 工具的 Heidolph DIAX 900 型组织匀浆器)。

(16) 另一方法是，不需要从细胞培养载体上移走支持物，而将适量的提取缓冲液直接添加到细胞单层上，裂解细胞；随后，将提取物转移到小管中以便储存。该方法在从细胞中提取 RNA 和蛋白质时同样有效，但是由于细胞裂解物的黏性高，提取工作相当困难。

(17) 为了将使细胞长时间受试对 RNA 含量影响的风险降到最小，在 TER 测量后应立即储存滤膜，进行 RNA 分离。我们不保存药物转运实验后的滤膜，因为这种实验的时间相对较长，RNA 数目可能已经改变。

(18) 向微型离心管中添加 400μL 裂解缓冲液(由制造商提供)并且确保滤膜完全浸入缓冲液，而离心管中含有附着 Caco-2 细胞的滤膜。用组织匀浆器将提取物均浆并剪切 15s，按照制造商说明书的程序处理提取物。对于敏感性分析，如定量 RT-RCR 而言，按照制造商(Qiagen)说明书推荐的进行柱上 DNase 处理，预计 RNA 的总量大约是 30μg。

(19) 另一方法是，可使提取物反复通过 21 号的针头，直到提取物的黏性降低。

(20) 以牛血清白蛋白(BSA)为标准的 BCA 分析所得的结果是，每微升提取物含有 1μg 的蛋白质。

268

(21) 如 3.3 所述，药物在实验培养液中的溶解度不足可能会导致药物的转运数量达不到可测量。在这种情况下，药物可在辅助溶剂中预溶，然后在实验溶液中稀释。

(22) 注意有一些药物会黏附到塑料表面。

(23) 蒸发步骤能够去除存在于药液中的放射性标记溶剂(如 ^3H-水和乙醇)，有时有必要进行重复蒸发，以彻底除去标记的溶剂。

(24) 改变取样体积以获得最佳实验条件。例如，快速转运药物，需要大样品量以维持供体和受体室之间的浓度梯度。大样品量也可用于重复分析，如 HPLC。

(25) 改变时间间隔以获得最佳实验条件。例如，快速转运药物，必须在较短的时间间隔取样以维持浓度梯度；而慢转运药物，必须在较长的时间间隔取样，使到达受体室

的浓度达到可检测的程度。

(26) 必须注意不可使用致毒浓度。许多化合物被加到底侧部时的毒性比加到顶侧大。

(27) 应该注意，抑制剂对细胞的可能毒性。通常实验者应对抑制剂进行单独实验，以评估抑制剂对细胞单层完整性的影响(如 ^{14}C-甘露醇)。抑制剂的最佳浓度可以在文献中查到。

致谢

感谢 Lucia Lazorova 对本章内容的精心校对，并提出宝贵意见。本工作得到瑞典医药研究委员会和 Wallenberg 基金的资助。

(刘泽隆　赵　平 译　李　晶　王　莉 校)

参 考 文 献

[1] Artursson, P. and Borchardt, R. T. (1997) Intestinal drug absorption and metabolism in cell cultures: Caco-2 and beyond. *Pharm. Res.* **14**, 1655-1658.

[2] Artursson, P. and Karlsson, J. (1991) Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **175**,880-885.

[3] Tavelin, S., Milovic, V., Ocklind, G., Olsson, S., and Artursson, P. (1999) A conditionally immortalized epithelial cell line for studies of intestinal drugtransport. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **290**,1212-1221.

[4] Irvine, J. D., Takahashi, L., Lockhart, K., et al. (1999) MDCK (Madin-Darbycanine kidney) cells: a tool for membrane permeability screening. *J. Pharm. Sci.***88**, 28-33.

269

[5] Fogh, I. Fogh, J. M., and Orfeo, T. (1977) One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J. Natl. Cancer Inst.* **59**, 221-226.

[6] Pageot, L. P., Perreault, N., Basora, N., Francoeur, C., Magny, P., and Beaulieu, J. F. (2000) Human cell models to study small intestinal functions: recapitulation of the crypt-villus axis. *Microsc. Res. Tech.* **49**, 394-406.

[7] Prentis, R. A., Lis, Y., and Walker, S. R. (1988) Pharmaceutical innovation by the seven UK-owned pharmaceutical companies (1964-1985). *Br. J Clin.. Pharmacol.* **25**, 387-396.

[8] Pinto, M., Robine-Leon, S., Appay, M., et al. (1983) Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol. Cell* **47**,323 - 330.

[9] Grasset, E., Pinto, M., Dussaulx, E., Zweibaum, A., and Desjeux, J. F., (1984) Epithelial properties of human colonic carcinoma cell line Caco-2: electrical parameters. *Am. J. Physiol.* **247**, C260-C267.

[10] Boulenc, X., Bourrie, M., Fabre, I., et al. (1992) Regulation of cytochrome P450IA1 gene expression in a human intestinal cell line, Caco-2. *J. Pharmacol.Exp. Ther.* **263**,1471- 1478.

[11] Hidalgo, I. J., Raub, T. J., and Borchardt, R. T. (1989) Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* **96**,736-749.

[12] Howell, S., Kenny, A. J., and Turner, A. J. (1992) A survey of membrane peptidases in two human colonic cell lines, Caco-2 and HT-29. *Biochem. J.* **284**,595-601.

[13] Schmiedlin-Ren, P., Thummel, K. E., Fisher, I. M., Paine, M. F., Lown, K. S., and Watkins, P. B. (1997) Expression of enzymatically active CYP3A4 by Caco-2 cells grown on extracellular matrix-coated permeable supports in the presence of 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D3. *Mol. Pharmacol.* **51**,741-754.

[14] Mesonero, J., Matosin, M., Cambier, D., Rodriguez-Yoldi, M. J., and BrotLaroche, E. (1995) Sugar-dependent expression of the fructose transporter GLUT5 in Caco-2 cells. *Biochem. J.* **312**,757-762.

[15] Hu, M. and Borchardt, R. T. (1992) Transport of a large neutral amino acid in a human intestinal epithelial cell line (Caco-2): uptake and efflux of phenylalanine. *Biochim. Biophys. Acta.* **29**, 233-244.

[16] Tamura, K., Lee, C. P., Smith, P. L., and Borchardt, R. T. (1996) Effect of charge on oligopeptide transporter-mediated permeation of cyclic dipeptides across Caco-2 cell monolayers. *Pharm. Res.* **13**, 1752-1754.

[17] Said, H. M., Ortiz, A., Kumar, C. K., Chatterjee, N., Dudeja, P. K., and Rubin, S.(1999) Transport of thiamine in human intestine: mechanism and regulation in intestinal epithelial cell model Caco-2. *Am. J. Physiol.* **277**, C645-C651.

[18] Kuo, S. M. (1998) Transepithelial transport and accumulation of flavone in human intestinal Caco-2 cells. *Life Sci.* **63**, 2323-2331.

[19] Ma, T. Y., Dyer, D. L., and Said, H. M. (1994) Human intestinal cell line Caco-2:a useful model for studying cellular and molecular regulation of biotin uptake. *Biochim. Biophys. Acta* **1189**,81-88.

[20] Said, H. M. and Ma, T. Y. (1994) Mechanism of riboflavine uptake by Caco-2 human intestinal epithelial cells. *Am. J. Physiol.* **266**, G15-G21.

270

[21] Ng, K. Y. and Borchardt, R. T. (1993) Biotin transport in a human intestinal epithelial cell line (Caco-2). *Life Sci.* **53**,1121-1127.

[22] Hunter, J., Hirst, B. H., and Simmons, N. L. (1993) Drug absorption limited by P-glycoprotein-mediated secretory drug transport in human intestinal epithelial Caco-2 cell layers. *Pharm. Res.* **10**,743-749.

[23] Hochman, J. H., Chiba. M., Nishime, J.,Yamazaki, M., and Lin, J. H. (2000) Influence of P-glycoprotein on the transport and metabolism of indinavir in Caco-2 cells expressing cytochrome P-450 3A4. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **292**,310-318.

[24] Hirohashi, T. , Suzuki, H., Chu., X. Y. , Tamai, I. , Tsuji, A. and Sugiyama, Y. (2000)Function and expression of multidrug resistance-associated protein family in human colon adenocarcinoma cells (Caco-2). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **292**, 265-270.

[25] Fujita, T., Yamada, H., Fukuzumi, M., Nishimaki, A., Yamamoto, A. and Muranishi, S. (1997) Calcein is excreted from the intestinal mucosal cell membrane by the active transport system. *Life Sci.* **60**,307-313.

[26] Artursson, P. , Palm, K. and Luthman, K. (1996) Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **22**,67-84.

[27] Lentz., K. A., Hayashi, J., Lucisano, L. J. and Polli. J. E. (2000) Development of a more rapid. reduced serum culture system for Caco-2 monolayers and application to the biopharmaceutics classification system.*Int. J. Pharm.* **200**,41-51.

[28] Liang, E., Chessic, K. and Yazdanian, M. (2000) Evaluation of an accelerated Caco-2 cell permeability model. *J. Pharm. Sci.* **89**, 336-345.

[29] Chong. S., Dando, S. A. and Morrison, R. A. (1997) Evaluation of Biocoat intestinal epithelium differentiation environment (3-day cultured Caco-2 cells) as an absorption screening model with improved productivity. *Pharm. Res.* **14**,1835-1847.

[30] Borst, P., Evers, R., Kool, M. and Wijnholds, J. (1999) The multidrug resistance protein family. *Biochim. Biophys. Acta* **1461**, 347-357.

[31] Artursson, P. (1990) Epithelial transport of drugs in cell culture. I. A model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive (Caco-2) cells. *J. Pharm. Sci.* **79**,476-482.

[32] Madara, J. L., Stafford, J., Dharmsathaphorn, K., and Carlson, S. (1987) Structural analysis of a human intestinal epithelial cell line. *Gastroenterology* **92**, 1133-1145.

[33] Thwaites, D. T., Hirst, B. H., and Simmons, N. L. (1993) Passive transepithelial absorption of thyrotropin-releasing hormone (TRH) via a paracellular route in cultured intestinal and renal epithelial cell lines. *Pharm. Res.* **10**,674-681.

[34] Wils, P., Warnery, A., Phung-Ba, V. and Scherman, D. (1994) Differentiated intestinal epithelial cell lines as *in vitro* models for predicting the intestinal absorption of drugs. *Cell. Biol. Toxicol.* **10**, 393-397.

[35] Wikman. A., Karlsson, J., Carlstedt, I., and Artursson. P. (1993) A drug absorption model based on the mucus layer producing human intestinal goblet cell line HT29-H. *Pharm. Res.* **10**, 843-852.

[36] Collett, A., Sims, E., Walker, D., et al. (1996) Comparison of HT29-18-Cl and Caco-2 cell lines as models for studying intestinal paracellular drug absorption. *Pharm. Res.* **13**,216-221.

[37] Quaroni, A., and Isselbacher, K., I. (1981) Cytotoxic effects and metabolism of benzo [a]pyrene and 7,12-dimethylbenz[a] anthracene in duodenal and ileal epithelial cell cultures. *J Natl Cancer Inst.* **67**, 1353-1362.

271

[38] Duizer, E., Penninks, A. H., Stenhuis, W. H., and Groten, J. P. (1997) Comparison of permeability characteristics of the human colonic Caco-2 and rat small intestinal IEC-18 cell lines. *J. Control. Release* **49**,39-49.

[39] Paul, E. C. A., Hochman, J., and Quaroni, A. (1993) Conditionally immortalized intestinal epithelial cells. Novel approach for study of differentiated enterocytes. *Am. J. Physiol.* **265**, C266-C278.

[40] Miller, J. H. and Heath, L. N. (1989) Growth, enzyme activity, sugar transport, and hormone supplement responses in cells cloned from a pig kidney cell line LLC-PK1. *J. Cell. Physiol.* **139**,538-549.

[41] Tanigawara, Y., Okamura, N., Hirai, M., et al. (1992) Transport of digoxin by human P-glycoprotein expressed in a porcine kidney epithelial cell line (LLC-PK1). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **263**, 840-845.

[42] Evers, R., Zaman, G. J., van Deemter, L., et al. (1996) Basolateral localization and export activity of the human multidrug resistance-associated protein in polarized pig kidney cells. *J. Clin. Invest.* **97**,1211-1218.

[43] Terada, T., Saito, H., Mukai, M., and Inui, K. (1997) Characterization of stably transfected kidney epithelial cell line expressing rat H+/peptide cotransporter PEPT1: localization of PEPT1 and transport of beta-lactam antibiotics. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **281**, 1415 -1421.

[44] Cho, M. J., Thompson, D. P., Cramer, C. T., Vidmar, T. J., and Scieszka, J. F. (1989) The Madin Darby canine kidney (MDCK) epithelial cell monolayer as a model cellular transport barrier. *Pharm. Res.* **6**,71-77.

[45] Karlsson, J. and Artursson, P. (1992) A new diffusion chamber system for the determination of drug permeability coefficients across the human intestinal epithelium that are independent of the unstirred water layer. *Biochim. Biophys. Acta* **1111**,204-210.

[46] Iumarie, C. and Malo, C. (1991) Caco-2 cells cultured in serum-free medium as a model for the study of enterocytic differentiation *in vitro*. *J. Cell. Physiol.* **149**,24-33.

[47] Wikman Larhed, A. and Artursson, P. (1995) Co-cultures of human intestinal goblet (HT29-H) and absorbtive (Caco-2) cells for studies on epithelial transport and integrity. *Eur. J. Pharm. Sci.* **3**,171-183.

[48] Delie, F. and Rubas, W. (1997) A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption: advantages and limitations of the Caco-2 model. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **14**,221-286.

[49] Lazorova, L., Gråsjö, J., Artursson, P., et al. (1998) Quantification and imaging of mannitol transport through Caco-2 cell monolayers using a positron-emitting tracer. *Pharm. Res.* **15**,1141-1144.

[50] Lindmark, T., Nikkilä, T. and Artursson, P. (1995) Mechanisms of absorption enhancement by medium chain fatty acids in intestinal epithelial Caco-2 cell monolayers. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **275**, 958- 964.

[51] de Bruin, M., Miyake, K., Litman, T., Robey, R. and Bates, S. E. (1999) Reversal of resistance by GF120918 in cell lines expressing the ABC half-transporter,MXR. *Cancer Lett.* **146**, 117-126.

[52] Benet, L. Z., Izumi, T., Zhang, Y., Silverman, J. A. and Wacher, V. J. (1999) Intestinal MDR transport proteins and P-450 enzymes as barriers to oral drug delivery. *J. Control. Release* **62**,25-31.

[53] International Human Genome Sequencing Consortium (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**,860-921.

[54] Venter, J., Adams, M., Myers, E., et al. (2001) The sequence of the human genome. *Science* **291**,1304-1351.

[55] Palm, K., Luthman, K., Ros, J., Gråsjö, J., and Artursson, P. (1999) Effect of molecular charge on intestinal epithelial drug transport: pH-dependent transport of cationic drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **291**,435-443.

[56] Dawson, D. (1991) Chapter I. Principles of membrane transport, p. 1-45. In *Handbook of physiology, section 6: the gastrointestinal system.* (Rauner B, ed.). American Physiological Society; Bethesda.

[57] Karlsson, J. and Artursson, P. (1991) A method for determination of cellular permeability coefficient and aqueous boundary layer thickness in monolayers of intestinal epithelial (Caco-2) cells grown in permeable filter chambers. *Int. J. Pharm.* 71, 55-64.

[58] Spiegel, M. (1968) *Mathematical handbook offormulas and tables.* McGraw-Hill Book Company, New York.

[59] Bevington, P. and Robinson, D. (1992) *Data reduction and error analysisfor the physical sciences. 2nd ed.* McGraw-Hill, New York.

第22章　培养上皮细胞的X射线显微分析

273

Godfried M. Roomans

1　引言

X 射线显微分析是在电子显微镜下进行的基本分析技术。这种技术基于样品原子被瞬间电子束激发产生的特征性 X 射线。每种原子产生的 X 射线是特异的，因此射线包含了样品中元素组成(和每种元素含量多少)的信息。除了特异的 X 射线外，电子也会产生背景 X 射线或连续射线，虽然这些射线不携带样品组成元素的信息，但背景射线的数量与样品受测体积的物质质量有关，因此被用于定量分析[1, 2](图 22.1)。一种元素能被探测到的最低浓度级为 mmol/(L·kg)，被检测到的最小重量级为 10^{-18} g 。分析的空间解析度与样品的厚度有关。一般地，当(薄)切片的被测体积直径为切片厚度 1/2 时，获得的空间解析度最好。如果要分析大体积样品，其空间解析度如扫描电子显微镜一样，有赖于加速电压及样品的组成。在 20kV 加速电压下，经冷冻干燥生物材料的经典值为 10μm [1]。

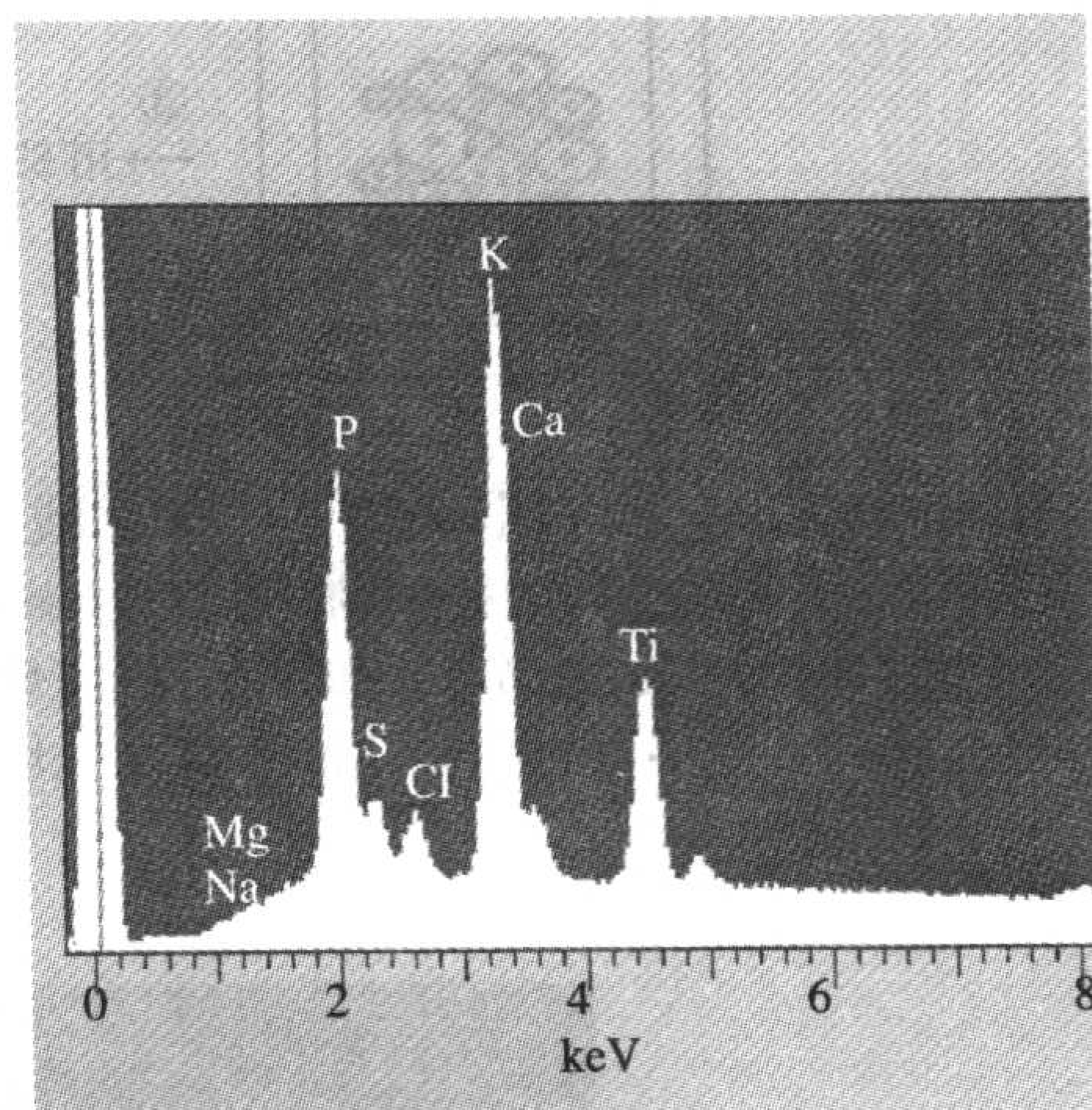


图 22.1　培养的支气管上皮细胞能量弥散 X 射线光谱所显示的内部元素峰值，同时也显示细胞生长支持物中钛制滤网的 Ti 峰值
0 电压下的峰值是人为设定的，用于校定能量的范围

X 射线显微分析培养的上皮细胞是阐释离子转运(病)生理机制的有效方法。众所周知，培养细胞的优点是：细胞培养系统简单，因为它通常仅由一种细胞构成；能避免系统效应，尤其对于人的细胞，由于操作或伦理限制，进行体内实验通常是不可能的；因为可以避免切片造成的假象，X 射线显微分析所需的细胞培养准备工作比组织块简单；对于研究离子转运，X 射线显微分析法与其他方法(如放射示踪法、荧光探针法)相比，其主要优势在于：能同时检测需要的所有元素。

274

细胞系、原代细胞、分离培养细胞都已用于实验研究[3~7]。用于研究的上皮细胞包括汗腺细胞系，来自结肠癌[9,10]、前列腺癌[11,12]和乳腺癌[13]的细胞系，角化细胞系[14]，来自汗腺[15]、呼吸道上皮细胞[16]、气管腺体[17,18]、子宫上皮[19]和分离的鼻腔上皮细胞[20]的原代细胞。

培养上皮细胞的 X 射线显微分析法常用于研究离子转运，因此无法使用传统的用于电子显微镜检的固定方法，因此冷冻技术就成为必需。上皮细胞的 X 射线显微分析研究

可以通过不同方式进行(图 22.2)。细胞可接种在基质上后，被冷冻，再用冰冻切片进行分析，方法与组织切片相同；细胞也可接种在固体基质上(渗透或非渗透)后被冷冻，冷冻干燥，在低加速电压的扫描电子显微镜下进行分析[10,13,21~23](图 22.3)。细胞还可以接种在电镜滤网上的超薄塑料膜上，冷冻干燥后，在高加速电压的扫描透射电子显微镜上进行分析[9,14,15,24](图 22.4)。

275

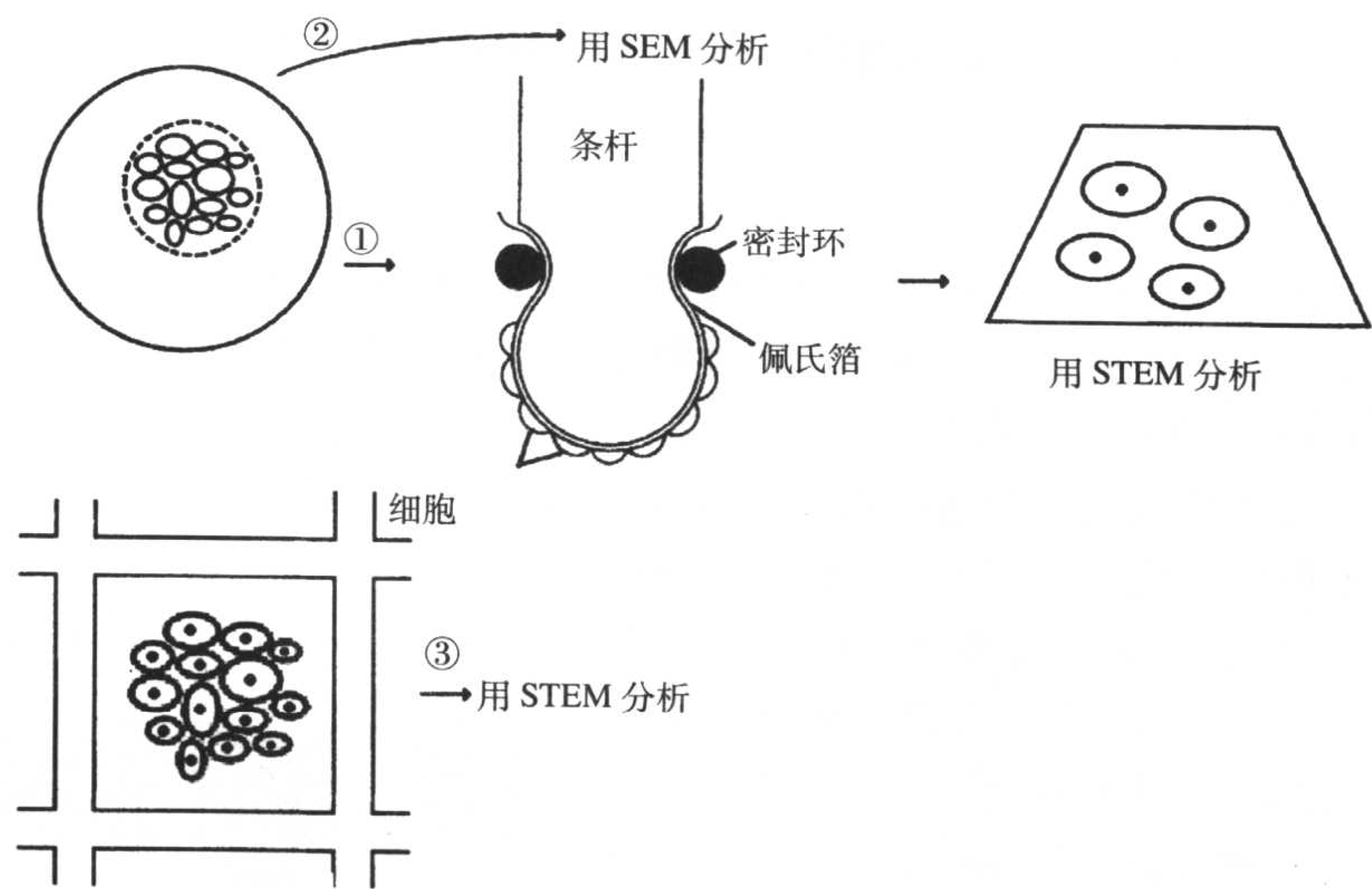


图 22.2　用于X 射线显微分析的培养上皮细胞制备流程图

在固体基质上培养的细胞可被打孔取出，包埋在棒状物上，在冷冻超薄切片机上进行冷冻切片；用 STEM[1]分析切片。细胞也可清洗除去培养液，经冷冻，冷冻干燥后用 SEM[2]分析。最后，细胞可接种在滤网上的薄塑料膜上，经清洗而除去培养液，冷冻干燥后用 STEM 分析

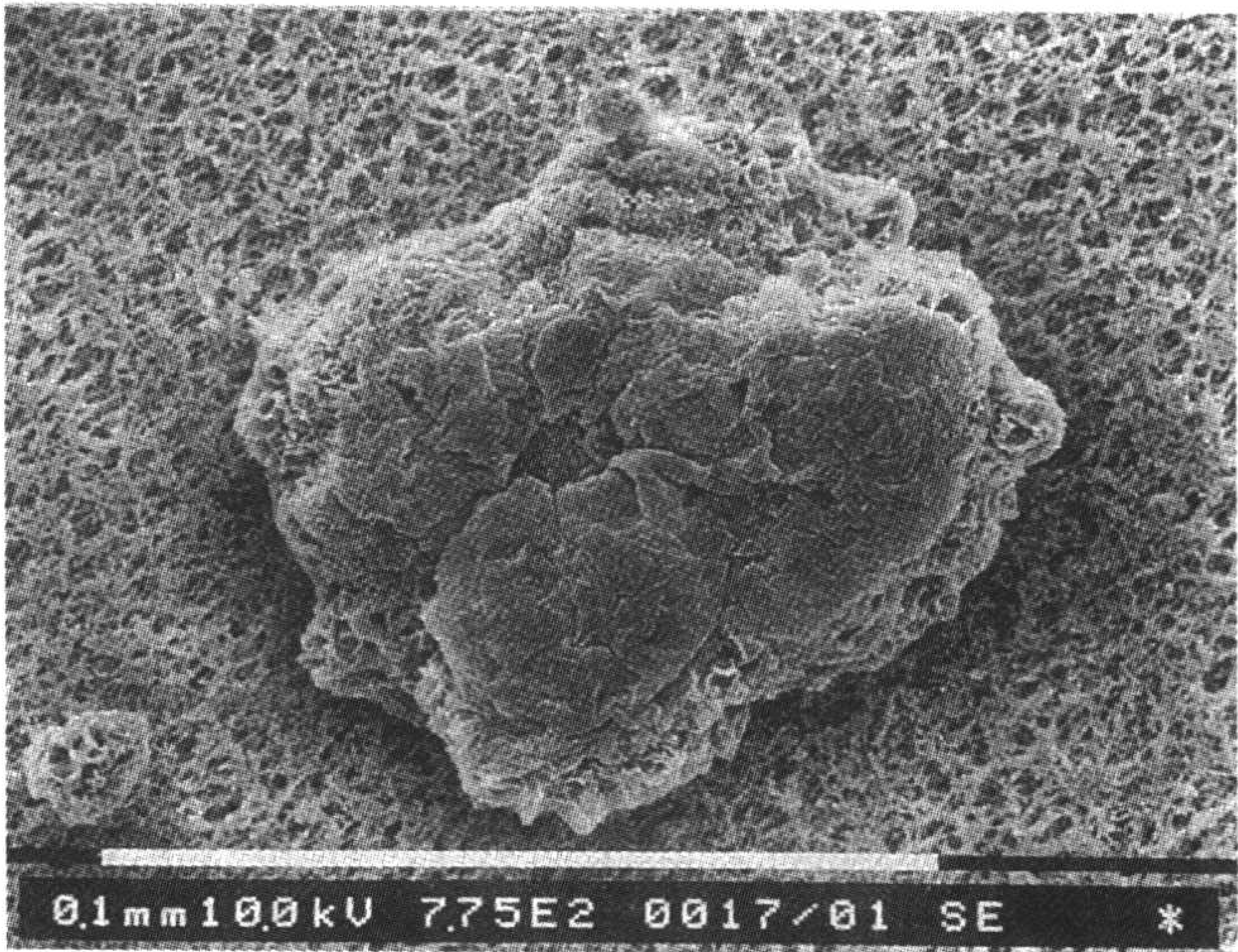


图 22.3　STEM 分析接种在 Millipore 滤膜上的 HT29 结肠癌细胞获得的扫描电镜照片

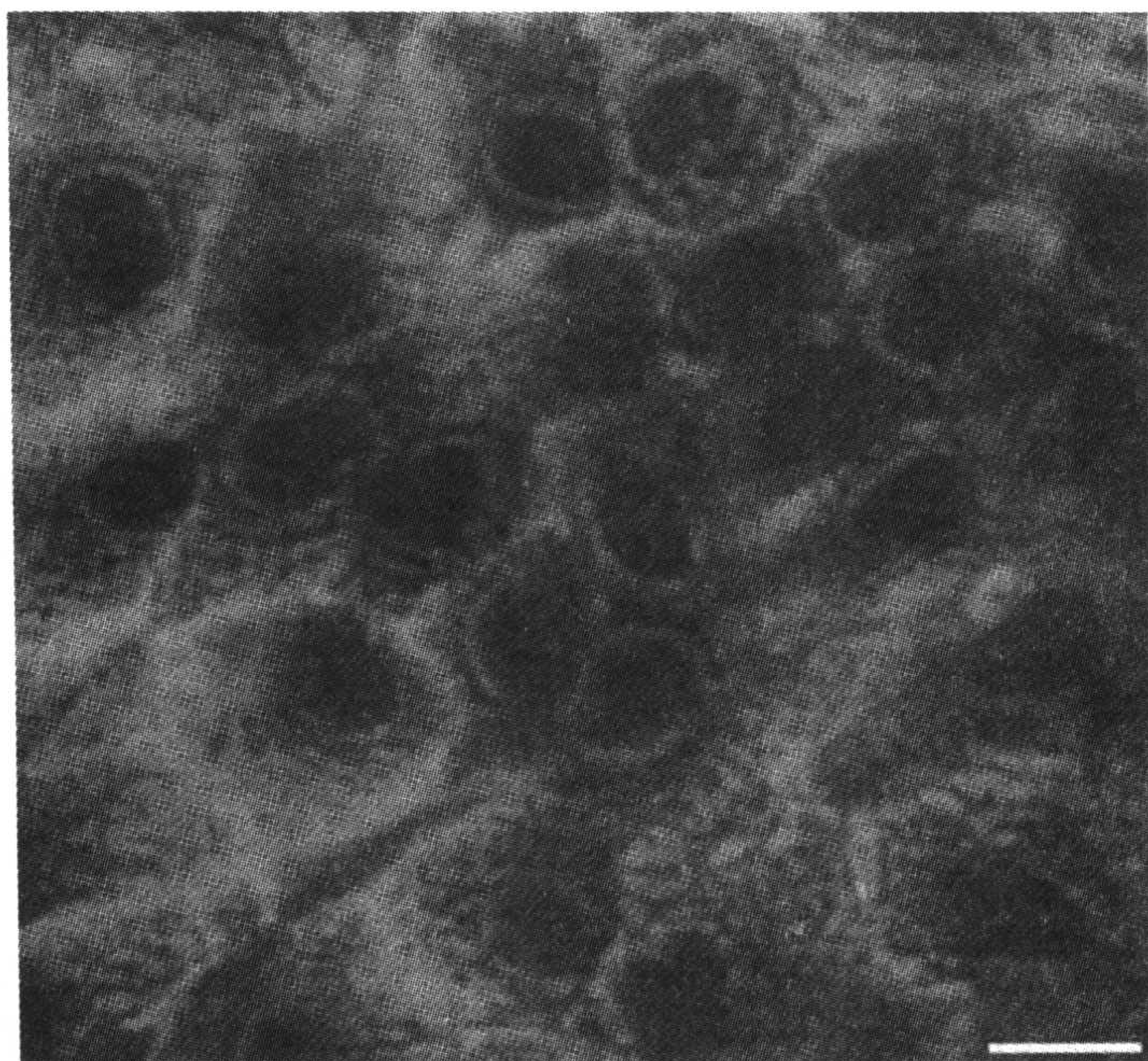


图 22.4　用于 STEM 分析，培养在钛制滤网 Formvar 膜上的角质细胞的数字扫描透射电子显微镜照片(标尺=5μm)

无论分析培养细胞的薄切片，还是分析植于固体基质或在滤网薄塑料膜上的所有细胞，这些方法都各有优缺点。

对培养细胞薄的冷冻切片，X 射线显微分析就可能在亚细胞水平进行，例如，可以分别分析不同的细胞器及细胞质(或细胞核)中的不同区域，但是用其他方法就不可能做到这一点。另外，避免了可能造成假象的清洗步骤[见注意事项(3)]。从理论上讲，定量分析虽然直接，但是这种方法的技术难度大，并且需要专业性设备(冷冻超薄切片机)、熟练的操作者及相当的努力，这就限制了一定时间内分析细胞的数量。分析需要在(扫描)透射电子显微镜下进行。

就技术而言，X 射线显微分析培养在固体基质上的细胞进行是较容易的方法。因为这些样本应是坚固、易操作、易分析的。这种方法的缺点在于：必须加入清洗步骤以及定量分析中出现的问题。这是由于在操作过程中，无法避免电子束对样本的过度穿透[见注意事项(5)]。通常这种方法只能分析细胞中最厚的部位，而亚细胞水平的分析是不可能的。低加速电压下这种分析的敏感度要低于高加速电压。分析需要 SEM。

在 STEM 下 X 射线显微分析培养在滤网薄膜上的细胞的敏感度更高并且定量分析更为直接。该法可能用于分析仅含有细胞质的区域，同时对这个区域与同时包含细胞质和细胞核的区域进行比较分析。然而，这些样品非常脆弱；在处理滤网过程中，如果薄膜破裂，将无法分析滤网，部分实验遭到干扰。这项分析需要(扫描)透射电子显微镜。尤其对于定量分析、钛或金制滤网参与光谱组成可能是个问题。

方法的最终选择依赖于细胞的类型、研究的问题及设备的有无。如果必须进行亚细胞水平分析或者细胞无法承受清洗过程，则切片分析是唯一的选择。在其他情况下，应优先选择培养在薄膜上的细胞，因为定量分析中的问题通常与电子的过度穿透有关。不管怎样，在许多科研项目中，分析固体基质可产生有相同生物意义的结果。

2 材料

2.1 X 射线显微分析培养细胞的冰冻切片

(1) 细胞培养基。DMEM、Ham's F12，或 RPMI 1640(Life Technologies)，添加或不添加 10% FBS(Life Technologies)。添加 100U/mL 青霉素(Sigma)和 100mg/mL 链霉素(Sigma)。关于培养基适宜于哪些特殊细胞类型培养的说明，一般由细胞供给者提供(例如，美国培养物种类收藏中心，商业性供应商或者生产细胞系的实验室)。

(2) 细胞培养箱。

(3) 细胞培养操作的无菌通风橱。

(4) 倒置光学显微镜。

(5) 离心机。

(6) 皮氏培养皿(Heraeus Instrument)。

(7) 从小牛皮中提取的、用于包被培养皿的 3mg/mL I 型胶原蛋白 S(Roche)(见 3.1.1)。

(8) 来源于人血浆，用于包被培养皿的 1mg/mL 纤粘连蛋白(Sigma)(见 3.1.1)。

(9) 包被培养皿的 1mg/mL 牛血清白蛋白 BSA(Sigma)(见 3.1.1)。

(10) 丛状玻璃纤维(本地生产)。

(11) 液氮冷却的液态丙烷或乙烷。

(12) 冷冻超薄切片机(见 2.5 供应商)。

278

(13) Pioloform 膜(polyvinyl butyral，聚丁酸乙烯脂)(SPI 供应商)。

(14) Thermanox(ICN Biochemicals)。

(15) n-庚烷。

(16) 2%琼脂(熔点 27~30℃)。

(17) 20%胶原。

(18) Formvar 膜(Merk)。

(19) 电子显微镜(扫描或扫描透射)(见 2.5 供应商)。

(20) 电子显微镜滤网。

(21) 冷冻干燥机。

2.2 X 射线显微分析培养在固体基质上的细胞

(1) 培养用的塑料器皿：培养瓶、移液管(Nalge-Nunc International)。

(2) 胰蛋白酶-EDTA：1L 磷酸缓冲液(PBS)中添加 2.5g 胰蛋白酶，1.86g EDTA。

(3) 硝酸纤维素膜(Schleicher& Schuell)或硝酸纤维素-醋酸纤维素膜，孔径 0.2μm。

(4) 细胞培养基[见 2.1 的步骤(1)]。

(5) Ringer 液：140mmol/L NaCl，5mmol/L HEPES，5mmol/L KCl，1mmol/L $MgCl_2$，1.5mmol/L $CaCl_2$，5mmol/L *D*-葡萄糖。

(6) 300mmol/L 甘露醇(溶于蒸馏水中)。

(7) 150mmol/L 乙酸(溶在蒸馏水中)。

2.3 X 射线显微分析培养在滤网膜上细胞

(1) 钛制滤网。

(2) 70%乙醇。

(3) 76mm× 26mm 玻片，ISO NORM 8037(Menzel)。

(4) 0.5%(*m*/*V*)Formvar 溶于 1,2-二氯乙烷。

(5) 玻璃培养皿。

(6) 12mm 圆形玻璃盖玻片。

(7) 碳层涂料(Balzers ,cat. no. CED 020)。

(8) 紫外线(2 Osram HNS 15W OFR 灯)。

(9) 0.3% Pioloform。

(10) 15mm 圆形 Thermanox 盖玻片。

2.4 X 射线显微分析分离的人鼻腔上皮细胞

(1) 0.6mm 无菌细胞刷(可在附近的药店买到)。

(2) 细胞培养基[见 2.1 的步骤(1)]。

(3) Cell-TAK(Becton Dickinson)。

2.5 供应商

2.5.1 电子显微镜

(1) Hitachi Science System, 1040 Ichige, Hitachinaka, Ibaraki Pref 312-0033,日本。

(2) JEOL, 1-2 Musashino 3-chome, Akishima,Tokyo196-8558, 日本。

(3) LEO, Clifton Road, Cambridge CB13QH, 英国。

(4) Philips Electron Optics (现为 FEI Company),P.O.Box 218, 5600 MD Eindhoven, 荷兰。

2.5.2 弥散 X 光能显微分析系统

(1) EDAX,Inc., 91 Mckee Drive, Mahwah, NJ 07430，美国。

(2) NORAN Instruments, Inc., 2551 W.Beltline Highway, Middleton, WI 53562-2697, 美国。

(3) Oxford Instruments Microanalysis Group, Halifax Road, High Wycombe HP123SE, 英国。

2.5.3 冷冻超薄切片机

(1) Leica Microsystem AG, Ernst-Leitz-Strasse 17-37, 35578 Wetzlar, 德国。

(2) RMC, Boeckeler Instrument, Inc., 4650 South Butterfield Drive, Tucson, AZ85714, 美国。

2.5.4 碳蒸发器

Blalzer，FL9496 Blalzers, Liechtenstein。

3 方法

3.1 培养细胞冷冻切片的 X 射线显微分析

培养细胞的冷冻制备和 X 射线显微分析的大部分步骤与组织的一样，改良的方法在文献中已有描述，且其全面的讨论超出了本章范围。以下章节的重点放在针对培养(上皮)细胞的方法步骤上。

3.1.1 培养皿或其他基底物的包被

(1) 包被液中含有无菌的 1mL 3mg/mL S 型胶原，1mL 1mg/mL 纤粘连溶液，10mL 1mg/mL BSA 液，88mL 适于特定细胞型的培养液。

(2) 按照每 $25cm^2$ 培养面积 1mL 包被液的比例，加入培养皿中 2h，然后吸出残液，这些包被的培养皿可立即应用或放置于−20℃备用。

(3) 其他底物(培养瓶、盖片)也可按相似方法包被。

3.1.2 培养皿中培养细胞的准备

(1) 培养皿中培养细胞。滴加 0.1mL 10^6 个/mL 的细胞悬液于培养皿中，37℃贴壁约 2h。然后添加 2mL 相应的培养液，将培养皿置于含有一定气体组成的(如 5%CO_2/95%空气)37℃培养箱中，每 48h 换液。光学显微镜下检查生长的细胞。

280

(2) 细胞生长至连续成片时，在细胞培养物上打出(用金属打孔机)一个直径约 10mm 的圆形区域。

(3) 如果实验需要在一定的实验溶液中孵育细胞，要在此步骤完成。

(4) 打孔打出的附着细胞薄片要拉伸在直径约 2mm 玻璃纤维杆的圆形末端，并快速浸入到液氮致冷的液态丙烷或乙烷中冷冻固定。

(5) 将样品安装在冷冻超薄切片机上。

3.1.3 在薄膜或盖片上培养细胞的制备

(1) 将细胞培养在 Thermanox 盖片或 Pioloform 膜上。

(2) 如果必要，如上所述包被支持物(见 3.1.1)。

(3) 细胞生长到连续，实验开始进行后，将附着细胞的 Pioloform 膜快速浸到液氮制冷的液态丙烷或乙烷液面上，快速冷冻。

(4) 利用 n-庚烷作为冷冻胶，将冷冻样品粘到冷冻超薄切片机的冷冻切片支架上。

3.1.4 细胞团的制备

(1) 如果需要细胞团作为研究对象，培养瓶或培养皿中的细胞应按以下方法用蛋白酶消化：去除培养液，每 $25cm^2$ 培养面积加入 2mL 胰蛋白酶-EDTA，使消化液恰好覆盖

细胞。37℃消化 10min，倾斜瓶皿，吸出胰蛋白酶-EDTA。用培养液(含血清)悬浮细胞。为了获得细胞团，需将悬液在 800*g* 离心 1min。

(2) 细胞团的黏性可以通过在细胞团中添加微量(约细胞团的体积)的熔化胶原或琼脂，重新悬浮细胞再离心获得。另外一种方法是，可用微量(20~40μL)300mmol/L 甘露醇重新悬浮细胞，冻置于由铝箔围绕在微量移液管顶端制成的微量容器中。

(3) 琼脂、胶原或石蜡的用量要少，否则单位体积的样品中最终含有的细胞数会过少。

(4) 在液氮制冷的液态丙烷或乙烷中快速冷冻细胞，或用商品化的快速冷冻仪，将细胞置于贴近液氮冷冻仪的金属块上。

(5) 将样品装在细胞冷冻超薄切片机上。

(6) 需要考虑到至少对于某些类型的细胞来说，其离子含量会受离心的影响[29]。要进行 X 射线显微分析的细胞，最好在低速下离心，使元素浓度尽可能地保持其体内水平。

3.1.5 冷冻超薄切片

(1) 使用低于−100℃的玻璃刀或金属刀。将冷冻样品(按以上章节所描述方法安装，见 3.1.2~3.1.4)切片，厚度约 100nm。

(2) 将切片转移到包被着两薄层塑料膜，如 Thermanox 或 Formvar(见 3.3)的电镜滤网上。

(3) 依靠重力作用或铜杆将切片压到滤网上。

(4) 将切片冷冻干燥数小时，然后转移到电镜上。

(5) 用 STEM 在高加速电压下进行样品分析，若进行定量分析需要进行超薄连续切片。

3.2 培养在固体支持物上细胞的 X 射线显微分析

(1) 在培养箱中，用相应的培养液在塑料培养瓶中培养不同的细胞。

(2) 如上所述[见 3.1.4，步骤(1)]，用蛋白酶-EDTA 消化收集细胞，然后将其直接接种到无菌硝酸纤维膜或硝酸纤维素-醋酸纤维素膜上，或其他合适的支持物上。

(3) 将滤膜放入皮氏培养皿中。

(4) 细胞黏附到滤膜上约需 3h，而后添加 3~4mL 完全培养基，使之生长 2~3d，再进行下一步实验。

(5) 每次换液时，用光学倒置显微镜观察细胞生长状况和可能的污染。

(6) 如果有生理刺激细胞的步骤，细胞可以在培养液或生理缓冲液(Ringer 液)中处理合适的时间。

(7) 冲洗滤膜，终止孵育。冲洗液可选择以下任一种：① 蒸馏水；② 150mmol/L 乙酸铵；③ 300mmol/L 甘露醇，冲洗 15~20s，以除去富含 NaCl 的实验溶液。冲洗液温度为 4℃[见注意事项(3)]。

(8) 冲洗滤膜时，液体盛放在有磁力搅拌棒的烧杯中，用镊子夹住滤膜在液体中冲洗。

(9) 取出滤膜，用滤纸吸去多余的液体，细胞在液氮制冷的液态丙烷中冷冻[见注意事项(4)]。

(10) 细胞冷冻干燥过夜。

(11) 滤膜用导电碳包被，以避免电镜下充电。

(12) 若不立即使用，将滤膜放在真空容器中或有干燥剂的容器中。

(13) 将滤膜装到样品夹上(碳制的较合适)，用 SEM 分析滤膜上的细胞。加速电压为 10~20kV[见注意事项(5)]，时间为 50~100s，分析时每个细胞只能获得一次光谱。

282 (14) 定量分析可在峰值与背景值的能量范围保持一致的条件下，用特征强度(峰，*P*)对背景强度(*B*)的比值(*P*/*B*)和样品 *P*/*B* 值与标准值的比较完成。

(15) 另外，若显微镜需装备有狭缝探测器，则可进行半定量分析。狭缝检测器可探测到轻元素(C、N、O)[见注意事项(1)和(7)]。

3.3 在滤网薄膜上培养的细胞的 X 射线显微分析

培养箱中，用相应的培养液在培养瓶中培养不同的细胞。

3.3.1 带有 Formvar 膜的钛制滤网的制备

应用以下方法准备有 Formvar 膜的 75 目钛制滤网[见注意事项(8)]。

(1) 用 70%乙醇清洗滤网。

(2) 载玻片浸入乙醇中清洗。

(3) 取出载玻片，用镜头纸擦干。

(4) 将载玻片用溶于 1,2-二氧乙烷的 0.5% Formvar 溶液浸泡，小心取出。Formvar 膜的厚度取决于取出时的速度，速度越快，膜越厚。增加 Formvar 的浓度也可增加膜的厚度。

(5) 垂直放置载玻片，让其干燥。

(6) 用刀片在玻片四边标记，以确定载玻片的膜边界。

(7) 用深的玻璃培养皿装上蒸馏水，旁边放盏灯，让水面反光。

(8) 为了清洁水面，用清洁的玻璃棒在水面上搅动以除去最上面的水层。

(9) 夹住 Formvar 包被的载玻片，与培养皿水面成 90°角，使水恰好与玻片底部接触，Formvar 膜就开始从玻璃上脱离下来。

(10) 将玻片慢慢放入水中，就可以看到膜从玻片上脱离，漂在水上。

(11) 取出玻片，检查漂浮的膜，入射光在膜上产生干涉色，银色或灰色纹路较好，而黄色、紫色或绿色则表明膜太厚。

(12) 干净滤网放在漂浮的膜上，每组 3 个。在滤网上加盖玻片。

(13) 在加膜的滤网和盖玻片上贴上一层石蜡膜，从水中取出。

(14) 晾干。

283 (15) 在薄膜上镀一薄碳层。将滤网放在碳蒸发器中，碳丝安装电极间。滤网与碳丝间距约 10cm。根据制造商说明书增加电流，抽真空，并加热碳丝。

(16) 紫外线灭菌滤网至少 3h 或过夜。

3.3.2 薄膜上培养的细胞的制备和分析

(1) 如上所述，用胰蛋白酶-EDTA 消化收集即将长满的细胞[见 3.4.1，步骤(1)]。

(2) 细胞在原培养液中恢复后，接种在薄膜包被的钛制滤网上。

(3) 如上所述，3 个滤网一组放置在圆玻璃片上，3 个玻片为一组放在皮氏培养皿中。

(4) 每个玻片上滴加一滴细胞悬液，并覆盖玻片。

(5) 约 3h 后，细胞贴壁。

(6) 添加新鲜的细胞培养液。

(7) 细胞在饱和湿度的 5% CO_2/95%空气培养箱中培养 3~7d(根据细胞类型)。

(8) 以下根据 Warley 等[25]发表的方法稍加改动。

(9) 制备 0.3% Pioloform 的薄膜，并使之漂浮在双蒸水中。

(10) 将滤网放在 Pioloform 膜上。

(11) Thermanox 盖片(圆环状，直径 15mm)放在滤网上。

(12) 制备物从水中捞出，Pioloform 膜面向上，灯下干燥。

(13) 用紫外灯灭菌有滤网的盖片。

(14) 在盖片上接种适当密度的细胞在滤网上生长。盖片接近滤网的区域可用于其他实验。

(15) 进行其他实验(如拮抗剂处理)，再用 3.2 中的步骤(7)[见注意事项(3)]所述的一种洗液洗涤细胞，结束实验。

(16) 用镊子夹住滤网在洗液中冲洗 15~20s，洗液盛放在有磁力搅拌器上的烧杯里。

(17) 用滤纸吸干多余液体。

(18) 用液氮致冷的液态丙烷冷冻滤网，然后冷冻干燥过夜。

(19) 在滤网上镀上碳层，以增加其在电镜上的导电性。

(20) 用 STEM(或带 STEM 装置的透射电镜)分析细胞。加速电压为 100kV 时最好，时间为 100s。

(21) 细胞中间细胞核所在的部分最厚，最易获得波谱。如果感兴趣，也可以得到四周仅含细胞质部分的波谱。

(22) 定量分析可通过特征强度(峰值，*P*)与背景强度(*B*)的比值(*P*/*B*)和比较 *P*/*B* 值与标准值进行分析[2]。另外一方法是半定量分析法，需要装备狭缝检测器的显微镜进行分析，狭缝检测器可检测到轻元素(N、C、O)[见注意事项(1)]。

284

3.4 分离的人鼻腔上皮细胞的 X 射线显微分析

(1) 用细胞刷从受试者鼻甲骨下方收集鼻腔上皮细胞。

(2) 受试者擤净鼻涕，彻底清洗后，直接用鼻镜观察欲刷细胞区域。

(3) 水平拿刷子，让刷子沿自身水平轴旋转 1min 获得细胞。然后，将刷子放在含有 1.5mL 培养液的 Eppendorf 管收集细胞。

(4) 另外一种方法是，将刷子在 Eppendorf 管末端开口处来回拉动，收集细胞。

(5) 如果必要，用其他受试者或冲洗出的鼻腔细胞重复细胞收集过程。

(6) 如 3.3.1 所述，制备有 Formvar 膜的 75 目钛制滤网，紫外线灭菌。

(7) 在接种细胞前 30min，根据 Cell-Tak (1~5μg/cm^2)制造商的说明书处理滤网，以便细胞贴壁。

(8) 800*g* 离心鼻腔上皮细胞 1min，用微量培养液(100μL)重新悬浮细胞，然后接种到滤网上。

(9) 37℃培养细胞 30min，让细胞贴壁到滤网上。

(10) 在光学显微镜下通过观察细胞上摆动的纤毛，检测细胞活力。

(11) 用实验培养液孵育细胞至合适的时间。

(12) 如 3.3.2 中的步骤(15)~(17)所述，冲洗和冷冻细胞，终止培养。如 3.3.2 中的步骤(18)~(21)所述，冷冻干燥滤网，镀碳层，并用 STEM 进行分析。

4 注意事项

(1) 薄样品(培养细胞的冷冻切片，培养在薄膜上的细胞)的定量分析一般用所谓的连续或 Hall 法[31]进行分析。这种方法的原理是，特定元素(峰值，*P*)的特征值对光谱非峰区背景值(空白放射，*W*)的比值是一定的。校正滤网(和样品夹)对光谱的影响[2]。样品元素的 *P*/*W* 值需与标准 *P*/*W* 值进行比较，标准中包含了已知浓度的有机矿物盐，并经过与样品一样的冷冻、冰冻切片、干燥等处理。至少有几个显微分析设备供应商能够提供生物样品薄切片的定量分析软件。软件的缺点在文献[2]和[32]中有详细论述。生物样品厚切片的定量分析一般通过 *P*/*B* 比值法分析，*P* 代表特征值，*B* 代表与 *P* 值在相同能量范围内测得的背景值(峰值下的背景，*B*)。峰值下的背景，而不是波谱非峰区的背景，可用于校正厚样品中 X 射线的吸收。样品夹对背景的影响则无需校正。这种定量分析的软件可由许多商业系统提供。

(2) 可用的固体基质有多种。对这种实验方法，基质材料是否具有通透性至关重要。如采用非渗透基质，添加到实验溶液中的物质只能到达细胞的顶膜，然而应用渗透基质时，物质可以到达基质底膜。从实际角度出发，基质材料应该易于操作，允许细胞生长，但在电镜下不会过度充电，且不应含有干扰分析的元素。建议不要使用玻璃，因为玻璃可能含有实验分析时感兴趣的某几种元素(Na、K)。另外，某些用于细胞培养的塑料在显微分析时，会表现为充电过度。

(3) 制备 X 射线显微分析用细胞的过程中，清洗过程可能是最严格的步骤。对每个实验应用的新细胞型都需对该程序进行评估。清洗过程之所以重要是因为培养液或实验溶液中含有盐分，若不能完全清除，细胞冷冻干燥后，盐分会包被在细胞表面，从而干扰分析结果。蒸馏水冲洗液的优点是冷冻干燥后不会有任何残留，但是，蒸馏水可能引起渗透压的变化，导致渗透压休克以及因膜的一般性损坏或特殊离子转运机制损坏而引起的离子外渗。乙酸铵洗液易挥发，冷冻干燥后的大部分乙酸铵或全部消失，或仅有微量残留。尽管 150mmol/L 乙酸铵几乎是等渗溶液，但也可能引起 pH 变化，从而导致离子转运的发生。300mmol/L 甘露醇是等渗透液，且不会引起细胞内离子成分的变化，但冷冻干燥后，细胞表面有一薄层粉状甘露醇，部分可用刷子除去，但仍会有部分残留。残留部分可能会降低细胞的清晰度，也可能使一层有机质贴在样品上，这样会“稀释”细胞发出的信号[见注意事项(5)]。这是定量分析的一个问题。在我们的实验中，用冷的蒸馏水或乙酸铵冲洗某些细胞，获得了较好的效果。如果用水或乙酸铵清洗后，发现明显的离子损失，则应换用甘露醇或其他类似特性的洗液(我们发现蔗糖较好，但比甘露醇的黏度大)。为确保整个清洗程序不会产生假象，必须对不同洗液中冲洗过的完整样品与冷冻但无冲洗过程的相同细胞的冷冻切片进行比较。

(4) 冷冻要快，以降低在冷冻过程中冰晶形成对细胞的损害；但是，由于分析必须

在低温溶液下进行，所以没有理由假定冷冻步骤至关重要。商用冷冻设备可如家用设备一样操作简单，冷冻剂可用乙醇或异戊烷来代替丙烷。

(5) 培养在固体基质上的细胞必须在低加速电压下分析，以免电压击穿细胞。即使如此也不能完全避免电子束击穿这一情况的发生。单层生长细胞经冷冻干燥后，厚度仅为 3μm，很容易被 10kV 的电压击穿。这意味着除细胞外，基质也可被激发(图 22.5)。若基质所含原子小于 10 个，传统的检测器检测不到，但会"稀释"样品中的元素密度导致 *P/B* 值变小。可采用不同加速电压分析样品，寻找获得 *P/B* 的最佳电压值。加速电压的低限是由能够激发样品中最重元素产生 X 射线所必需的电子能量来设定的。若采用低电压仍不能避免电击穿，则必须用一种元素做"内参"进行半量分析。在许多情况下，如实验过程仅有数分钟的离子流活动，磷和硫是最常用的"内参元素"，因为这两种元素的浓度在实验中不易发生变化。在这两种元素中，磷最常用，因其浓度较硫高，所以更容易进行定量统计。实验中磷和硫会发生变化，如研究细胞蛋白质和核酸成分变化的长期实验，就不能用硫和磷作为内参元素。但是元素间的浓度比值，如 Na/K、Na/Cl 或 P/S 等数据都能提供有价值的生物信息并有助于解决遇到的科学问题。甘露醇(蔗糖、葡萄糖)可能出现在冻干后的样品顶部，它能"稀释"细胞内元素的浓度(图 22.5)，这个问题与过穿透导致的基质稀释样品中元素浓度的问题相似，因此可以用相同的方法解决。

287

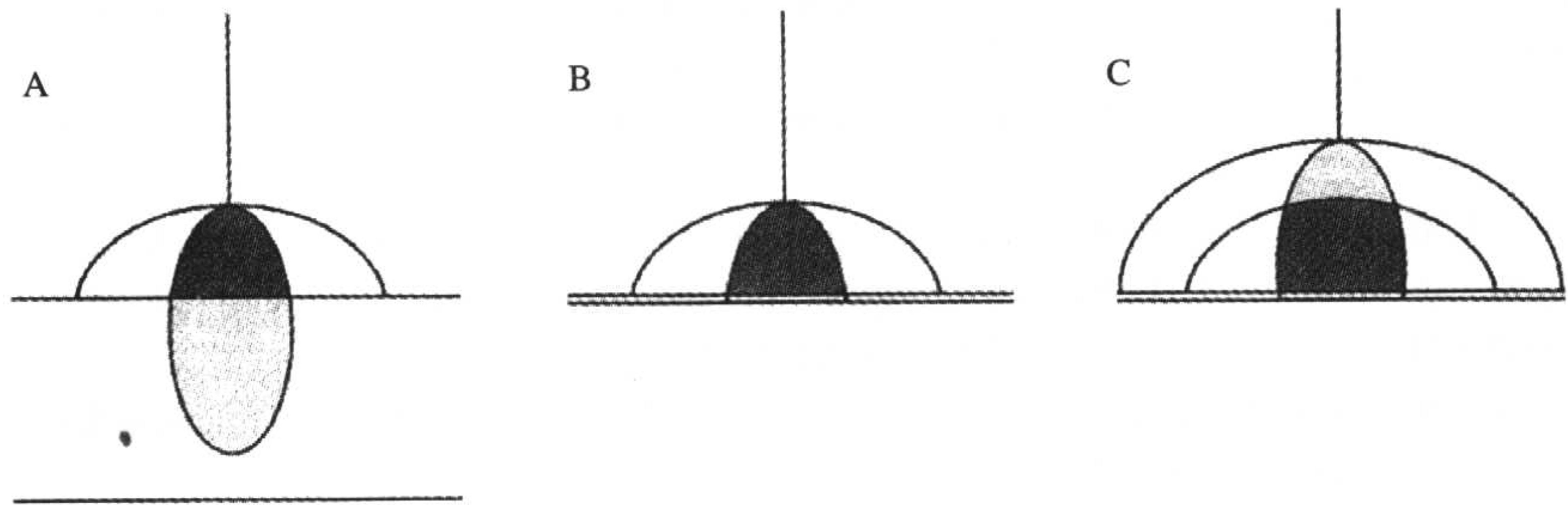


图 22.5 SEM 分析生长条件不同的细胞

(A) SEM 分析生长在厚基质上的细胞。电子束完全穿透细胞，并激发基质。产生 X 射线谱的受测体积包括细胞(黑色区域)和基质(白色区域)。(B) STEM 分析生长在薄膜上，用水或导电缓冲液冲洗的细胞。薄基质(黑)对光谱的影响极小，光谱主要由细胞产生(白)。(C)STEM 分析生长在薄膜上用甘露醇冲洗的细胞。甘露醇覆盖细胞，参与形成光谱，"稀释"了细胞内元素产生的信号

(6) 尽管 SEM 或 STEM 的电子束很窄，入射电子撞击样品并与样品原子发生弹性或非弹性碰撞后也会发散。所以 X 射线在细胞内产生的光束直径比入射光束的直径大得多。根据分析位点细胞厚度，被测体积可能实际上占据了细胞的大部分。

(7) 一些 X 射线显微分析系统的制造商能提供所谓的样品半定量分析软件。尽管半定量分析是从材料学(氧化物、氮化物、碳化物的分析)的应用中发展来的，但是，若 X 射线检测器有一窄的塑料(不是铍)窗，这种方法也可用于生物学样品的检测。狭缝检测器可用来分析轻元素波谱。定量分析时要考虑到这些元素(C、N、O)的存在，这些元素通常约占样品的 90%。由于氢元素被忽略了——它不能被 X 射线显微分析检测(氢元素不产生 X 射线)，因此这种分析方法仍存在一些小问题。但是，氢在冷冻、干燥组织中的浓度被非常保守地假定为 5%，所以利用软件在 5%的氢浓度下进行半定量分析可以有

效地校正结果。半定量分析的优点是无需标准的制备和分析[2,32]。但这种方法不能在生物材料上广泛应用。

(8) 使用钛的原因是其无毒，且其 X 射线光谱不会干扰细胞的 X 光谱。如果从毒性角度考虑，金制滤网也是一种选择，它已经用于此类研究[25]。但是，金发出的 X 光谱可能与细胞中磷产生的峰有部分重叠。

致谢

非常感谢 Romuald Wróblewski 博士、Anca Dragomir 和 Marianne Ljungkvist 对本文
288
所述技术的帮助。本研究由瑞典医药研究委员会(项目号 07125)和瑞典心肺基金会资助。

(刘泽隆 彭 莎 译 李 晶 王莉 校)

参 考 文 献

[1] Roomans, G. M. (1988) Introduction to X-ray microanalysis in biology. *J. Electron Microsc. Tech.* **9**,3-18.

[2] Roomans, G. M. (1988) Quantitative X-ray microanalysis of biological specimens. *J. Electron Microsc. Tech.* **9**,19-44.

[3] Zierold, K. and Schäfer, D. (1988) Preparation of cultured and isolated cells for X-ray microanalysis. *Scanning Microsc.* **2**,1775-1790.

[4] Von Euler, A., Pålsgård, E., Vultvon Steyern, C., and Roomans, G. M. (1993) X-ray microanalysis of epithelial and secretory cells in culture. *Scanning Microsc.* **7**, 191-202.

[5] Warley, A. (1994) The preparation of cultured cells for X-ray microanalysis. *Scanning Microsc.* (Suppl) **8**, 129-138.

[6] Wroblewski, R. and Wroblewski, J. (1994) X-ray microanalysis of endocrine,exocrine and intestinal cells and organs in culture: technical and physiological aspects. *Scanning Microsc.* (Suppl) **8**,149-162.

[7] Roomans, G. M., Hongpaisan, J., Jin, Z., Mörk, A. C., and Zhang, A. (1996) *In vitro* systems and cultured cells as specimens for X-ray microanalysis. *Scanning Microsc.* (Suppl) **10**, 359-374.

[8] Ring, A., Mörk, A.-C., and R oomans, a. M. (1995) Calcium-activated chloride fluxes in cultured NCL-G3 sweat gland cells. *Cell Biol. Int.* **19**, 265-278.

[9] Von Euler, A. and Roomans, G. M. (1992) Ion transport in colon cancer cell cultures studied by X-ray microanalysis. *Cell Biol. Int. Rep.* **16**,293-306.

[10] Zhang, W. and Roomans, G. M. (1998) Volume induced chloride transport in HT29 cells studied by X-ray microanalysis. *Microsc. Res. Tech.* **40**,72-78.

[11] Fernández-Segura E., Cañizares, F. J., Cubero, M. A., Warley, A., and Campos,A. (1999) Changes in elemental content during apoptotic cell death studied by electron probe X-ray microanalysis. *Exp. Cell Res.* **253**, 454-462.

[12] Salido, M., Vilches, J., Lopez, A., and Roomans, a. M. (2001) X-ray microanalysis of etoposide induced apoptosis in the PC-3 prostatic cancer cell line. *Cell Biol. Int.*, **25**, 499-508.

[13] Fernandez-Segura, A., Cañizares, F. J., Cubero, M. A., Revelles, F., and Campos,A. (1997) Electron probe X-ray microanalysis of cultured epithelial tumour cells with scanning electron microscopy. *Cell Biol. Int.* **21**,665-669.

[14] Grängsjö, A., Pihl-Lundin, I., Lindberg, M., and Roomans, a. M. (2000) X-ray microanalysis of cultured keratinocytes: methodological aspects and effects of the irritant sodium lauryl sulfate on elemental composition. *J. Microsc.* **199**,208-213.

[15] Hongpaisan, J. and Roomans, G. M. (1998) Extracellular UTP regulates Na, Cl and K transport in primary cultures from human sweat gland coils. *Cell Struct. Funct.* **23**,239-245.

[16] Sagström, S., Roomans, G. M., Wroblewski, R., Keulemans, J. L. M., Hoogeveen,A. T ., and Bijman, J. (1992) X-ray microanalysis of cultured respiratory epithelial cells from patients with cystic fibrosis. *Acta Physiol. Scand.* **146**,213-220.

289
[17] Zhang, A. L. and Roomans, G. M. (1997) Ion transport in cultured pig tracheal submucosal gland acinar cells studied by X-ray microanalysis. *Eur. Resp. J.* **10**,2204-2209.

[18] Zhang, A. L. and Roomans, G. M. (1999) Multiple intracellular pathways for regulation of chloride secretion in cultured pig

trachea submucosal gland cells. *Eur. Respir. J.* **13**,571-576.

[19] Iin, Z. and Roomans, G. M. (1998) X-ray microanalysis of uterine epithelial cells in culture. *Micron* **28**, 453-457.

[20] Dragomir, A., Andersson, C., Aslund, M., Hjelte, L., and Roomans G. M. (2001) Assessment of chloride secretion in human nasal epithelial cells by X-ray microanalysis. *J. Microsc.* **203**,277-284.

[21] Abraham, E. H., Breslow, J. L., Epstein, J., Chang-Sing, P., and Lechene, C. (1985) Preparation of individual human diploid fibroblasts and study of ion transport. *Am. J. Physiol.* **248**, C154-C164.

[22] Von Euler, A. and Roomans, G. M. (1991) X-ray microanalysis of cAMP-induced ion transport in cystic fibrosis fibroblasts. *Cell Biol. Int. Rep.* **10**,891-898.

[23] Hall, S. R., Sigee, D. C., and Beesley, I. E. (1992) Scanning X-ray microanalysis of microcarrier cultured endothelial cells: elemental changes during the transition to conflueucy and the effect of ionophore A23187 . *Scanning Microsc.* **6**,753-763.

[24] Iames-Kracke, M. R., Sloane, B. F., Shuman, H., Karp, R., and Somlyo, A. P. (1980) Electron probe analysis of cultured vascular smooth muscle. *J. Cell. Physiol.* **103**,313-322.

[25] Warley, A., Cracknell, K. P., Cammish, H. B., Twort, C. H., Ward, I. P., and Hirst, S. I. (1994) Preparation of airway smooth muscle cells for study of element concentrations by X-ray microanalysis. *J. Microsc.* **175**, 143-153.

[26] Zierold, K., Hentschel, H., Wehner, F., and Wessing, A. (1994) Electron probe X-ray microanalysis of epithelial cells: aspects of cryofixation. *Scanning Microsc.* (Suppl) **8**,117-127

[27] Zierold, K. (1997) Effects of cadmium on electrolyte ions in cultured rat hepatocytes studied by X-ray microanalysis of cryosections. *Toxicol. Appl. Pharmacol.***144**,70-76.

[28] Zierold, K. (2000) Heavy metal cytotoxicity studied by electron probe X-ray microanalysis of cultured rat hepatocytes. *Toxicol. In Vitro* **4**,557-563.

[29] Warley A. (1987) X-ray microanalysis of cells in suspension and the application of this technique to the study of the thymus gland. *Scanning Microsc.* **1**, 1759-1770.

[30] Fernandez-Segura, E., Canizares, F. J., Cubero, M. A., Campos, A., and Warley, A. (1999) A procedure to prepare cultured cells in suspension for electron probe X-ray microanalysis: application to scanning and transmission electron microscopy. *J. Microsc.* **196**,19-25.

[31] Hall T. A., Anderson, H. C., and Appleton. T. (1973) The use of thin specimens for X-ray microanalysis in biology. *J. Microsc.* **99**,177-182.

[32] Roomans, G. M. (1990) X-ray microanalysis, p. 347-412. In *Biophysical electron microscopy* (Hawkes, P. W. and Valdre, U., eds.). Academic Press, London.

291

第23章 ENU诱导大鼠乳腺上皮细胞突变

George Stoica

1 引言

研究大鼠乳腺癌变模型为探讨人乳腺癌发病机制提供了参考。大鼠模型的研究表明，化学致癌物质是乳腺癌发生的诱变因素，癌症的发生需要致癌物质与未分化的、增生的乳腺相互作用。人与啮齿类动物间的比较研究帮助我们确定了乳腺癌是起源于乳腺未分化的终端结构的。人乳腺Lob1的终端小管与大鼠乳腺的终端芽(TEB)有许多相似点。大鼠的TEB与女性的Lob1是腺管癌变的起源[1]。这说明建立大鼠模型对于研究人乳腺癌机制很有必要。人们在体外设计了许多实验来阐释化学物质诱导乳腺上皮细胞转化为瘤细胞的机制。

最近，有几个实验室报道了大鼠乳腺上皮细胞能够在体外转化为癌细胞。首先报道该结果的有以下研究组：Brennan等[2]及Dao与其同事[3]把大鼠乳腺组织与致癌剂7,12-二甲苯蒽(DMBA)共培养；Richards、Nandi[4]及Greiner等[5]将大鼠乳腺细胞与致癌剂DMAB或*N*-甲基-*N*-亚硝基脲(MNU)共培养。众所周知，DMBA和MNU都是具有强基因毒性的大鼠乳腺致癌剂[6]。

292

以往的研究显示，在体内，*N*-乙烷基-*N*-亚硝基脲(ENU)是有活性的大鼠乳腺基因毒性致癌剂[7,8]。与MNU一样，ENU也是烈性烷基化物，与其他致癌剂相比(如DMBA)，ENU不需要酶的激活就可以直接起作用。因为ENU的半衰期较短，所以它在体内、体外的作用相对较迅速[8,9]。ENU的靶目标可能是DNA、各种RNA和多种蛋白质[10~13]。

考虑到对建立大鼠乳腺上皮细胞癌变体外实验模型的普遍需求和目前建立这种模型存在公认的困难[14~19]，我们感觉检测ENU在这个模型中是否具有致癌作用是非常重要的。设计这个实验的想法来源于ENU在体内对大鼠乳腺有致癌作用的报告[7,8]，其他的报告显示，在体外ENU处理非上皮类型的细胞，如啮齿类的成纤维细胞和神经细胞，也显示了致癌作用[20,21]。

2 材料

2.1 细胞的来源与分离

(1) 雌性Sprague-Dawley大鼠，50日龄，无致病原(Charles River Laboratory, Wilmington, MA)。

(2) 凹面玻璃皿。

(3) 无菌解剖刀。

(4) 100mL 锥形烧瓶。

(5) 裂解液：DMEM (Life Technologies)，添加 0.1%胶原酶(Worthington Biochemical Company), 100IU/mL 青霉素，100μg/mL 链霉素(Life Technologies)。

(6) 旋转水浴锅。

(7) 尼龙筛，孔径为 74μm(Cistron, Elmsdorf, NY)。

(8) 60mm 培养皿。

(9) 生长液：DMEM 中加入 25%马血清，20ng/mL 氢化可的松 (Sigma)，20ng/mL 绵羊催乳素(Sigma)，20ng/mL 胰岛素(Sigma), 10ng/mL 表皮生长因子(Collaborative Research), 100IU/mL 青霉素，100μg/mL 链霉素。

(10) 0.25%胰蛋白酶，0.02% EDTA(Life Technologies)。

2.2 致癌物质脉冲

(1) ENU 晶体(Pfaltz and Bauer, Stamford,CT)。

(2) 磷酸-柠檬酸盐缓冲液，pH4.2。

(3) 无血清 DMEM。

(4) Hank 液(HBSS)(Life Technologies)。

(5) 组织培养瓶(T25 与 T75)(Life Technologies)。

2.3 流式细胞仪测定细胞 DNA 含量

(1) 0.05mg/mL 碘化丙锭，用 0.1%柠檬酸盐溶液配制。

(2) 大鼠外周血白细胞。

(3) Coulter Epics V MDADS 系统(Hialeah,FL)。

2.4 DNA 合成

(1) ^{3}H-胸苷(1mCi/mL, 6.7mCi/mg; New England Nuclear, Boston MA)。

(2) 5%三氯乙酸(TCA)。

(3) 0.2mol/L NaOH。

(4) 闪烁计数器(Beckman)。

2.5 细胞计数

(1) 台盼蓝。

(2) 血细胞计数器。

2.6 染色体分析

(1) 0.04mg/mL 秋水仙酰胺(Life Technologies)。

(2) 无水乙醇，分析级。

(3) 冰醋酸，分析级。

(4) 带有橡胶吸头的巴氏管。

(5) 预处理的显微镜载玻片，3 英寸×1 英寸，厚度为 0.96~1.06mm。

(6) 吉姆萨血液染色。

2.7 克隆形成

(1) 琼脂液 I：DMEM，2% sea plaque 琼脂糖(FMS,Marine Colloids Division, Rockland, ME)，25%马血清，0.2%重碳酸盐。

(2) 琼脂液 II：DMEM, 0.33% sea plaque 琼脂糖，25%马血清，0.2%重碳酸盐。

2.8 肿瘤生成

雌性无胸腺裸鼠(Harlan Sprague-Dawley, Madison, WI)。

2.9 组织学

10% 福尔马林。

2.10 支原体检测

Hoescht Stain 33258 (Calbiochem-Behring)。

3 方法

3.1 细胞的来源与分离

(1) 采用以往描述的步骤，取 50 日龄雌性大鼠，从整个乳房脂垫处(腹股沟至腋窝)取上皮细胞[22]。

(2) 把组织放在凹面玻璃皿上，用无菌解剖刀切碎。

(3) 把切碎的组织放入装有 50mL 裂解液的锥形烧瓶(100mL)中，37℃旋转水浴锅中孵育 40min。

(4) 用 74μm 孔径的尼龙筛过滤悬浮细胞。

(5) 细胞种植在含有培养液的 60mm 培养皿上[见注意事项(1)]。

(6) 放入饱和湿度的 CO_2 培养箱中培养，CO_2 浓度为 10%，培养温度为 37℃。

(7) 12h 后，吸出皿中悬浮的上皮细胞，放入另一个皿中[见注意事项(2)]。

(8) 将上一步骤重复 5 次(为了增加上皮细胞数量)。

(9) 为进一步分离上皮细胞与间质细胞，应用胰蛋白酶梯度消化 2~10min(从 0.01%~0.02%，逐渐增加胰蛋白酶浓度)。

(10) 用橡皮刮棒机械分离法，除去未受胰蛋白酶影响的间质成分。

(11) 2 个月后可以形成纯度较高的立方型上皮细胞克隆[见注意事项(3)及图 23.1 和图 23.2]。

3.2 注入致癌物质

(1) 用磷酸-柠檬酸盐缓冲液溶解 ENU 晶体。每次实验该溶液均要新鲜配制。

(2) 上皮细胞培养至第 3 代时，无血清培养基中加入 ENU，终浓度分别为 15、50、

100 及 500μg/mL[见注意事项(4)]。

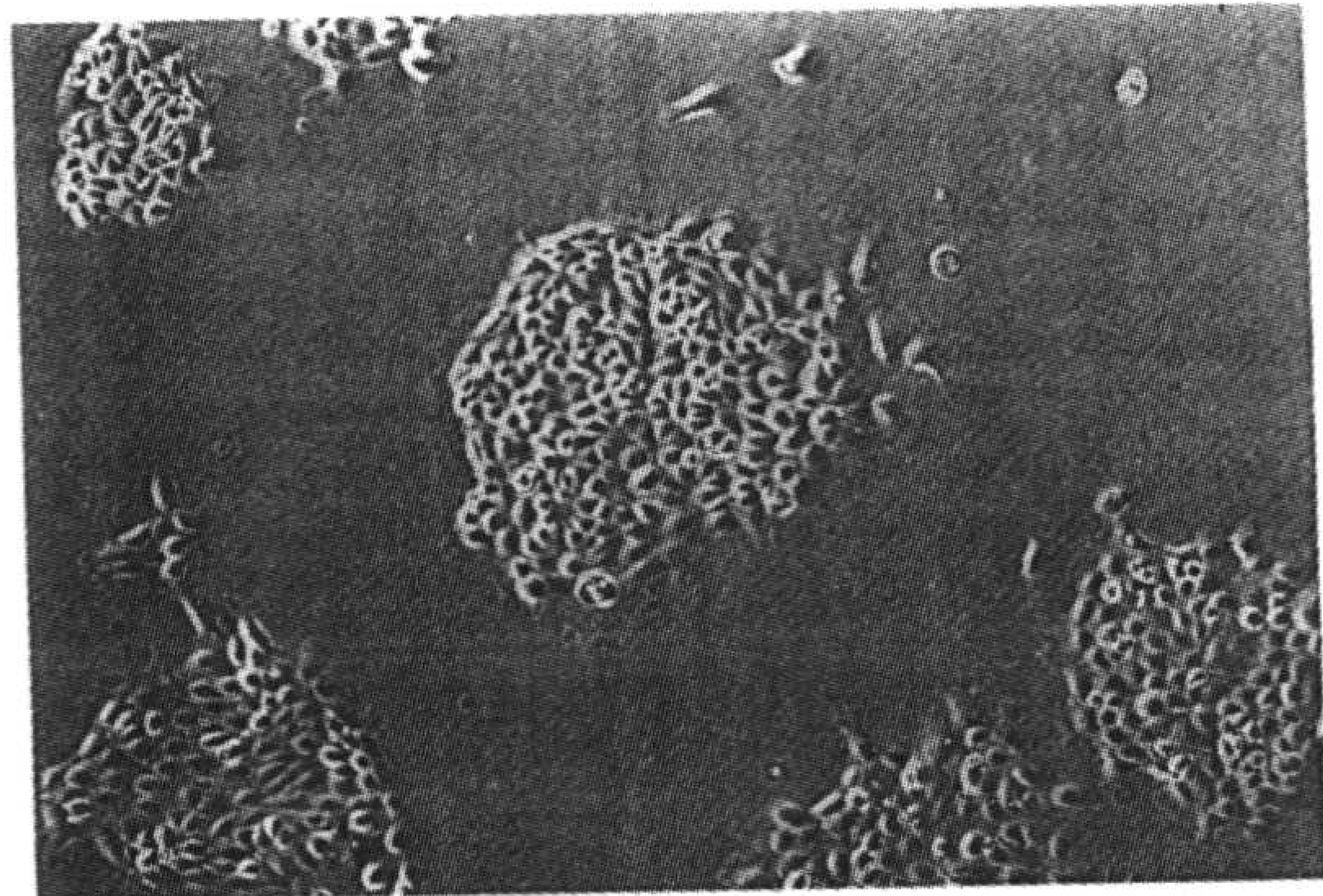


图 23.1　倒置显微镜下观察到的培养 2 个月后的立体上皮细胞克隆

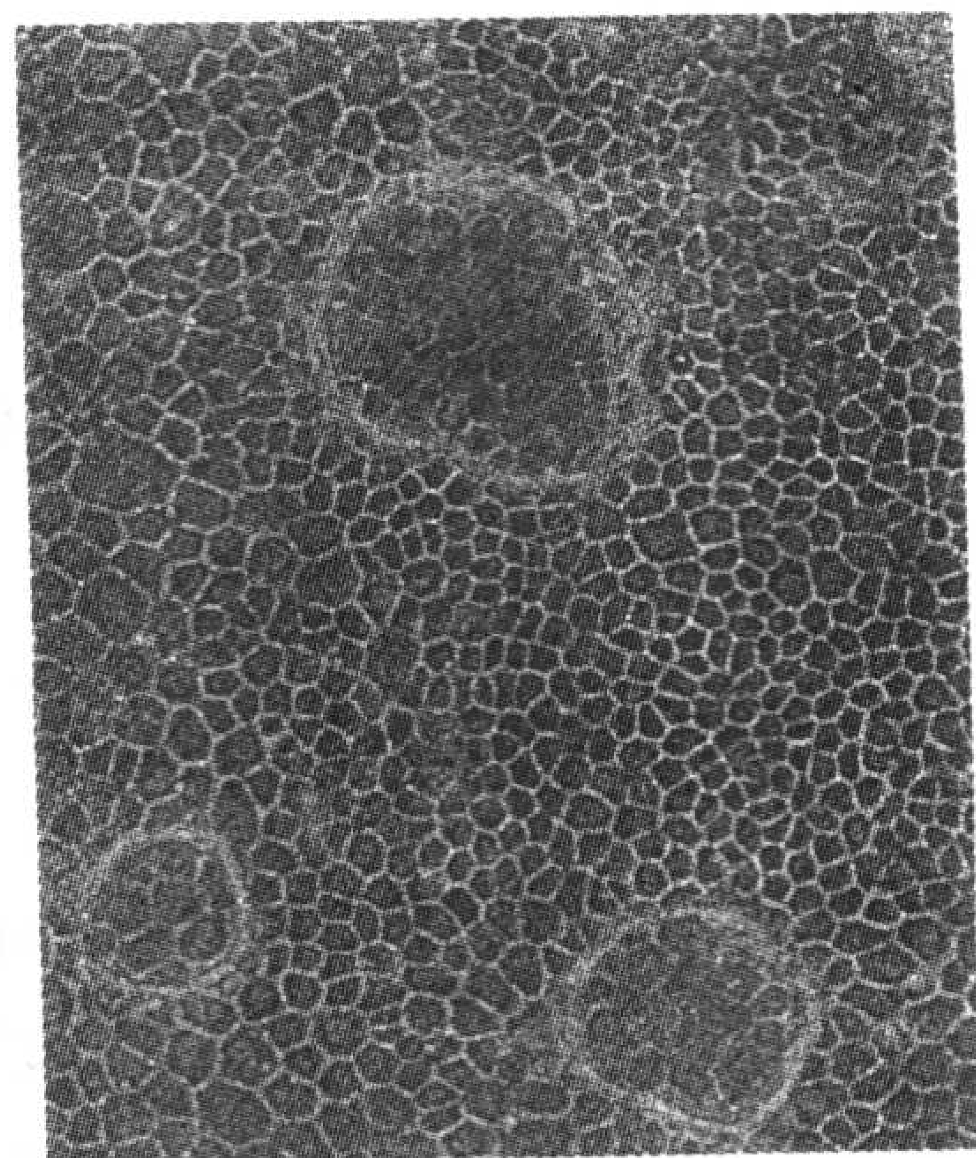


图 23.2　倒置显微镜下观察正常乳腺上皮细胞铺满的情况，其中有鹅卵石状的圆顶克隆形成

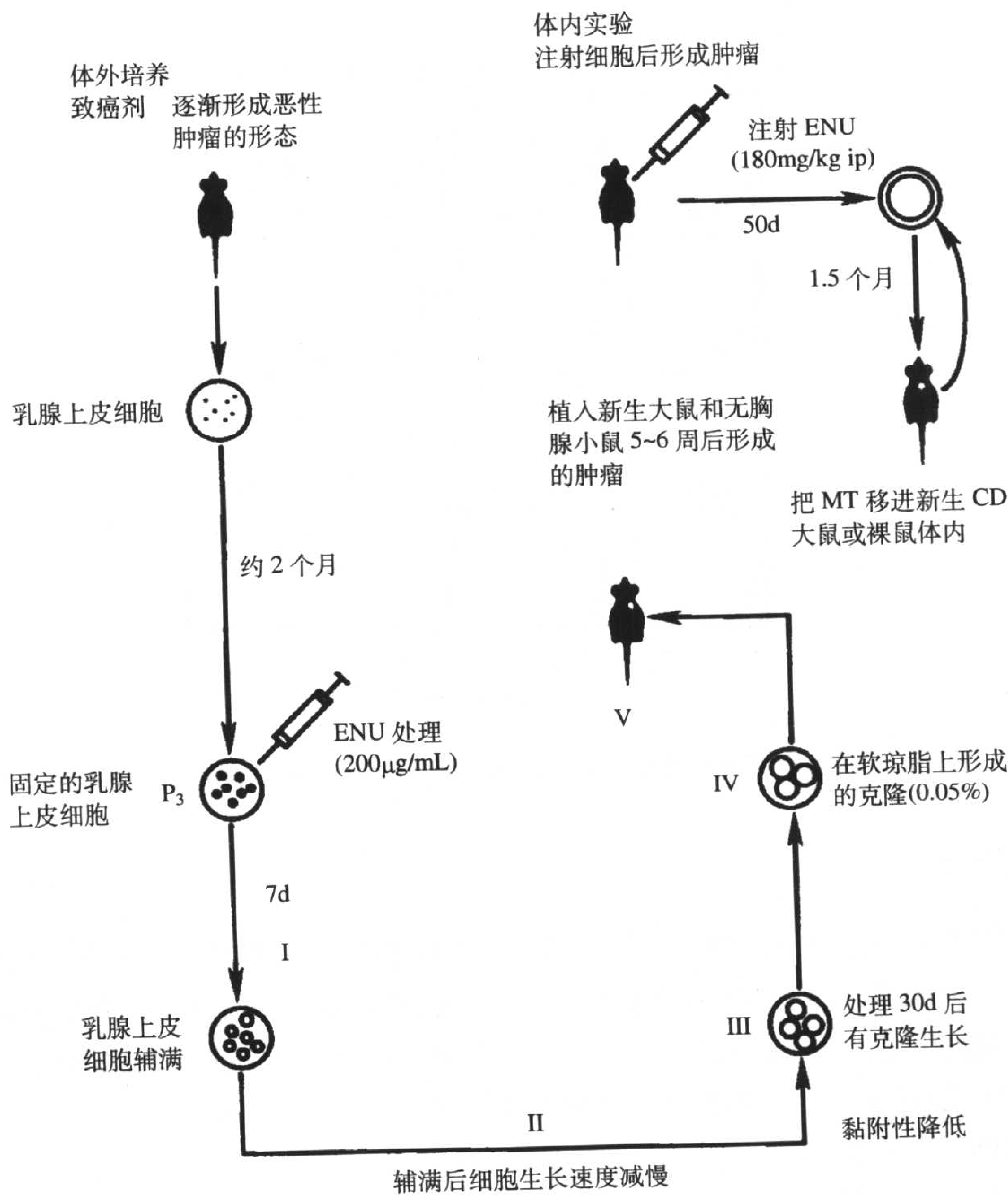


图 23.3　ENU 在体内外诱导乳腺上皮细胞肿瘤转化的图解

(3) 2h 后，弃掉上清，用 HBSS 洗细胞 2 遍。

(4) 加入正常培养液。

295　(5) 用相差显微镜检测培养细胞的形态特征，并且拍照[见注意事项(5)]。图 23.3 是大鼠乳腺上皮细胞体外肿瘤转化的各个阶段的示意图。

3.3 细胞 DNA 含量的流式细胞仪检测

(1) 用低渗碘化丙锭溶液稀释第 3 代大鼠乳腺上皮细胞，细胞浓度为 1×10^6。

(2) 外周血白细胞与刚消化的大鼠乳腺上皮细胞以同样的方式处理，检测在 DNA 的图像中 2C 波出现的位置。

(3) 样品中的细胞团块若超过 1%时，应弃之。

(4) 用 Coulter Epics V MDADS 系统测量荧光。

(5) 氩离子激光发射光的波长为 488nm，为了让 2C 波峰出现在 6 频道，应该设定输出能量。PBL 与乳腺细胞的突变系数应分别为 3%和 3.2%。

(6) 收集 0、50、100 及 500μg/mL 的 ENU 处理细胞的数据，在出现波峰时(ENU 处理 1~4d)记数 10 000 个细胞(图 23.4)。

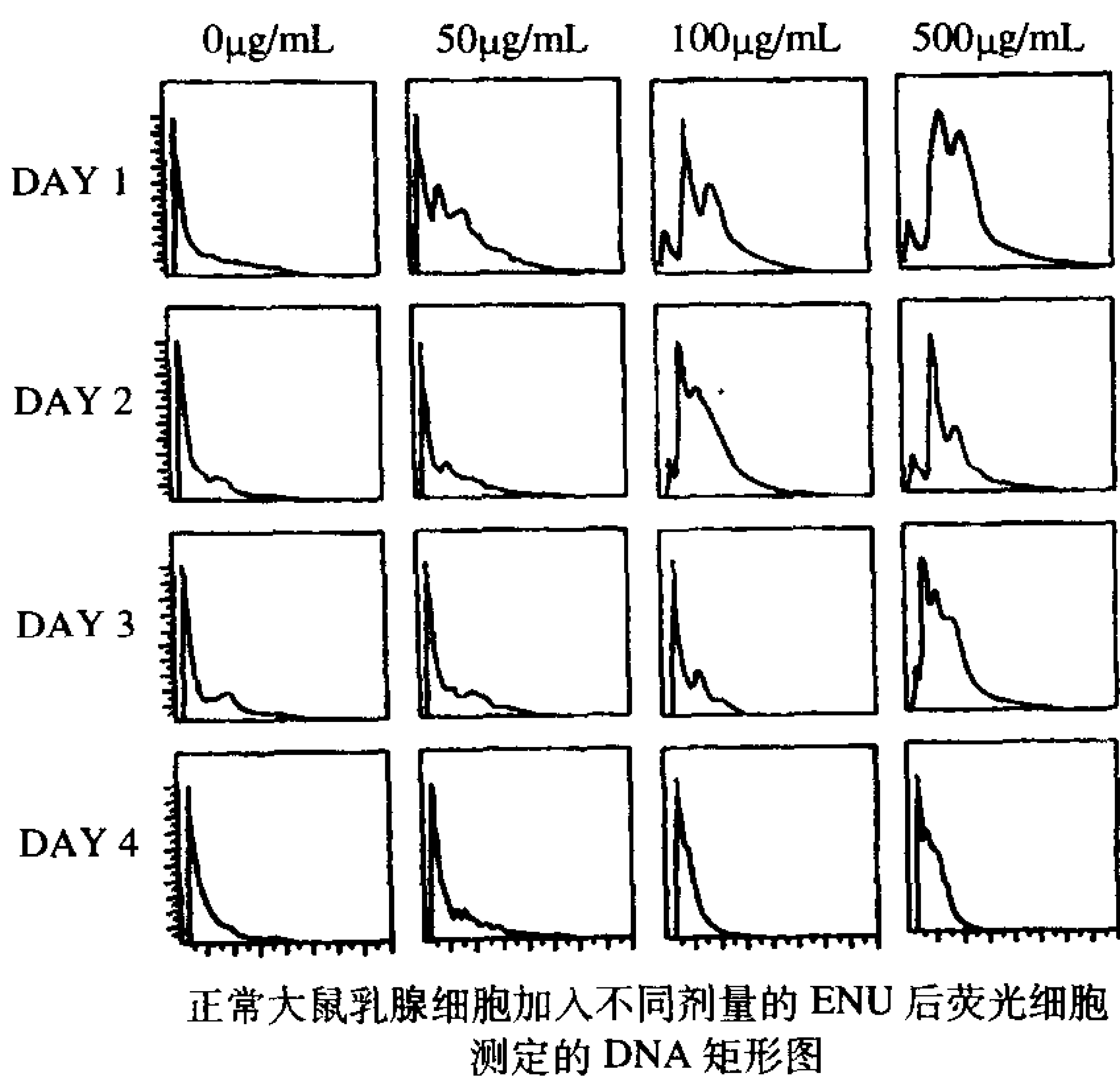


图 23.4 正常乳腺上皮细胞培养液中加入 ENU 后用流式细胞仪测定的 DNA 矩形图

296　3.4 DNA 合成

(1) 第 3 代大鼠乳腺上皮细胞接种在 60mm 的培养皿上，浓度为 7×10^5 个/mL。

(2) 2d 后，当细胞达到 50%~60%融合时，分别加入 0、25、50 及 100μg/mL ENU。

297　(3) ENU 处理后的 1、2、3、4 及 5d 后，用 ^{3}H-胸苷脉冲标记 3 个培养皿。

(4) ^{3}H-胸苷处理 1h 后，胰蛋白酶消化细胞，进行 ^{3}H-胸苷分析。

(5) 用 HBSS 洗涤细胞。

(6) 5%三氯乙酸 37℃孵育 1h。

(7) 4℃、4430*g* 离心 15min。

(8) 用 0.2mol/L NaOH 溶解不溶于 TCA 的物质，37℃作用 15min。

(9) 把 0.2mol/L NaOH 提取物等份放入闪烁管中，用闪烁计数器计数。

3.5 细胞计数

用台盼蓝分离技术与细胞计数器对每个剂量处理的细胞计数 3 次(不同培养皿)，间隔 24h，直至 120h。

3.6 染色体分析

(1) 根据已建立的方法[24~26]，略作修改，进行染色体分析。

(2) 简单叙述如下，在细胞对数生长期用秋水仙酰胺处理 1h。

(3) 胰蛋白酶消化。

(4) 细胞悬液 114*g* 离心 10min。

(5) 弃掉上清时不要触动沉淀，加入蒸馏水。

(6) 在水中再次悬浮细胞。

(7) 37℃孵育 15min。

(8) 加入甲醇：冰醋酸(3：1，*V/V*)，固定细胞 15min。

(9) 制备盖玻片：用窄口巴氏管把细胞悬液滴在玻璃载玻片上。

(10) 制备的载玻片应快速晾干。

(11) 在 65℃温箱内干燥 2d。

(12) 改良 Yunis 的方法制备 G 带，胰蛋白酶消化的时间约为 15s。

(13) 据世界卫生组织的标准对染色体畸变进行记分。

(14) 重复实验，包括对照组。

(15) 每一个样品应记录 100 个分裂中期的染色体。

3.7 在半固体琼脂培养基中克隆及克隆形成

(1) 采用 MacPherson 介绍的方法，略做改进，检测大鼠乳腺上皮细胞在琼脂中的克隆形成能力。

(2) 基底层应含有 5mL 的琼脂液 I。

(3) 每个培养皿中加入 1.5mL 琼脂液 II(含有 7.5×10^4 个乳腺上皮细胞)。

(4) 在 37℃、6%的 CO_2 培养箱中孵育乳腺上皮细胞。

(5) 5~6 个星期后，对直径大于 0.1mm 的克隆或大于 40 个细胞的克隆计数。

(6) 用巴氏管吹打单个克隆可得到克隆亚系(直径大于 1μm 的克隆)，用胰蛋白酶消化 1~2min，接种到 60mm 培养皿中进一步培养。

3.8 肿瘤形成

(1) 选择 10 只新生的同系雌性大鼠或 2 个月龄的无胸腺裸小鼠，乳腺髋后脂垫处皮下注射 ENU 处理过的细胞及对照细胞(1×10^6 个/0.05mL 培养基)。

(2) 每周必须检查所有大鼠和小鼠接种部位的肿瘤生长情况，连续 3 周。

298

(3) 细胞接种 5~6 星期后，处死动物，手术切除所有明显的结节和肿瘤。

(4) 对这些组织进行细胞培养、电子显微镜检测及组织学分析。

3.9 组织学

(1) 10%福尔马林固定组织。

(2) 石蜡包埋，作 5μm 切面。

(3) 苏木精、伊红染色(H&E)。

299

3.10 支原体检测

用 Chen 使用的方法，对所有细胞培养物进行 Hoechst 33258 染色，检测支原体的污染。

3.11 统计分析

用两因素方差分析，再用唐肯氏多变域验后分析变化是否显著，$P<0.05$ 为差异显著。

4 注意事项

(1) 激素和表皮生长因子对体外维持及刺激乳腺细胞的增生是必需的，最初 5 代细胞的培养液 DMEM 中含有 25%的马血清。与犊牛血清相比，马血清促进上皮细胞的增生能力更强。

(2) 细胞及细胞聚集物应高密度种在 60mm 的培养皿上，10h 后，倒置显微镜下会观察到悬浮细胞、聚集细胞及管状结构细胞的出现，其中一些细胞与大鼠乳腺 TEB 非常相似，这样的结构将来会形成乳腺上皮细胞克隆。

(3) 间隔 12h，悬浮的细胞、聚集物及 TEB 轻轻转移到另一个培养皿中。上述步骤重复几次。最初的培养皿中通常仅剩下间质细胞(黏附在培养皿上)，但在其他培养皿中，上皮细胞开始生长，接种后的 24~72h，黏附在培养皿底部的细胞聚集物及 TEB 发育成上皮细胞克隆。10d 后，几个培养皿中会出现由间质细胞包围的多种形状的上皮细胞克隆，多数培养皿是在较后的时期接种的。使用尼康倒置显微镜的标记物镜，可以鉴定上皮细胞的克隆，并且使用胰蛋白酶和橡胶刮棒可以去掉间质细胞。这个步骤重复几次，直至仅剩下上皮细胞克隆。2 个月后，培养皿中可以长满上皮细胞。一旦确定生长，把细胞转移到 T75 瓶中，并像以前描述的方法维持细胞生长。第一代上皮细胞在培养皿上的黏着力很强，所以用胰蛋白酶完全移去比较困难。乳腺上皮细胞不能完全从母本培养瓶中完全移出，一旦细胞丢失时，剩下的细胞就可以作为将来继续传代培养的细胞源。培养液应隔一天换一次。上皮细胞的典型形状是椭圆形，且有一个圆形的顶(图 23.1 和图 23.2)。

(4) ENU 是具有基因毒性的化学致癌物质，所以应当采用安全的操作程序，在操作过程中，要注意对人体的保护，了解正确的中和毒性、试剂处理及如何使用等方法。为了中和致癌物质及存放被污染的器具，旁边应备有装有 2%NaOH 的容器。操作时应戴塑料手套、面罩、护目镜及防护服。

300

(5) 大鼠上皮细胞转型时形态的改变是与增生频率加快、多核细胞暂时增加、锚定依赖性减弱及屋顶形状有关的。

(6) 用 ENU 处理乳腺上皮细胞可以引起许多细胞遗传物质的改变，最常见的是染色体与同源染色体的互换、三条 10 号染色体、双小体及性染色体的丢失(表 23.1)。这些突变与致癌物质有剂量依赖关系，浓度较高时染色体突变发生率较高。然而，去掉致癌物质后，转化为肿瘤的乳腺上皮细胞仍维持二倍体核型。

表 23.1 ENU 体外处理大鼠乳腺上皮细胞(P_4 及 P_5)对染色体的影响

ENU 剂量 /μL/mL	众数或染色体数 (范围)	畸变染色体细胞的百分数 (范围)	染色体畸变的类型/100 个细胞				
			单染色体断裂	异染色体断裂	染色体交换	多染色体断裂	双小体
对照	38(36~60)	9(8~10)	4	5	0	0	0
在取样前 ENU 处理 6h							
25	38(28~60)	15(14~16)	6	9	0	0	0
50	38(26~80)	25(20~30)	5	10	5	3	2
100	48(28~90)	45(40~50)	20	10	5	5	5
200	40(26~90)	50(48~52)	30	15	0	5	5
在取样前 ENU 处理 24h							
25	38(28~60)	10(9~11)	10	0	0	0	0
50	44(24~60)	12(10~14)	5	3	2	0	2
100	50(28~90)	25(24~26)	10	2	10	0	3
200	52(26~96)	27(17~29)	12	4	10	0	1
500	MI	0	0	0	0	0	0

MI：有丝分裂抑制

(刘为敏 译 沈 政 王 莉 校)

参 考 文 献

[1] Russo, J. and Russo, I. H. (1993) Developmental pattern of the human breast and susceptibility to carcinogenesis. *Eur. J. Cancer Prev.*, **3**, 85-100.

[2] Brennan, M. J. (1976) Murine and rat mammary tumors as models for the immunological study of human breast cancer. *Cancer Res.* **36**, 728-733.

[3] Dao, T. L. and Sinha, D. (1972) Mammary adenocarcinoma induced in organ culture by 7,12dimethybenzanthracene. *J. Natl. Cancer Inst.* **49**, 591-593.

[4] Richards, J. and Nandi, S. (1978) Neoplastic transformation of rat mammary cells exposed to 7, 12-dimethylbenzanthracene or N-nitrosomethylurea in cell culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 38-68.

[5] Greiner, J. W., Dipaolo, J. A., and Evans, C. H. (1983) Carcinogen-induced phenotypic alterations in mammary epithelial cells accompanying the development of neoplastic transformation. *Cancer Res.* **43**, 273-278.

[6] Welsch, C. W. (1985) Host factors affecting the growth of carcinogen induced rat mammary carcinomas: a review and tribute to Charles Brenton Huggins. *Cancer Res.* **45**, 3415-3443.

[7] Stoica, G., Koestner, A., and Capen, C. (1983) Characteristics of N-ethyl-N-nitrosourea induced mammary tumors in the rat. *Am. J. Pathol.* **110**, 161-169.

[8] Stoica, G., Koestner, A., and Capen, C. (1984) Neoplasms induced with high single doses of N-ethyi-N-nitrosourea in 30-day-old Sprague-Dawley rats with special emphasis on mammary neoplasia. *Anticancer Res.* **4**, 5-12.

[9] Gichner, T. and Veleminsky, J. (1982) Genetic effects of *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoquanidine and its homologs. *Mutation Res.* **99**, 129-242.

[10] Singer, B. (1979) N-nitroso alkylating agents: formation and persistence of alkyl derivatives in mammalian nucleic acids as contributing factors in carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* **6**, 1329-1339.

[11] Druckrey, H. (1973) Chemical structure and action in transplacental carcinogenesis and teratogenesis, p. 45. In *Transplacental carcinogenesis, publication no.*4. International Agency for Cancer Research, Lyon.

[12] Magee, P. N., Barnes, J. M. (1969) Carcinogenic nitroso compounds. *Adv. Cancer Res.* **10**, 163-246.

302

[13] Rice, J. M. (1973) An overview of transplacental chemical carcinogenesis. *Teratology* **8**, 113-135.

[14] Franks, L. M. and Wigley, C,B. (1979) *In vitro* transformation in the respiratory tract, p. 137-162. *In Neoplastic transformation in differentiated epithelial cell systems in vitro* (Franks and Wigley, eds.). Academic Press, New York.

[15] Fusenig, N., Breitkreutz, D., Boukamp, P., Lueder, M., Irmscher, G., and Worst, P. K. M. (1979) Chemical carcinogenesis in mouse epidermal cultures: altered expression of tissue specific functions accompanying cell transformation, p. 37-98. In *Neoplastic transformation in differentiated epithelial cell systems in vitro* (Franks and Wigley, eds.). Academic Press, New York.

[16] Indo, K. and Maivaji, H. (1979) Neoplastic transformation and abnormal differentiation in foetal rat keratinizing epidermal cells in culture, p. 99-112. In *Neoplastic transformation in differentiated epithelial cell systems in vitro* (Franks and Wigley, eds.). Academic Press, New York.

[17] Kuroki, T., Drevon, C., Saint Vincent,L., and Montesano, R. (1979) Properties of the IAR-series of liver epithelial cells transformed by chemical carcinogens, p. 173-188. In *Neoplastic transformation in differentiated epithelial cell systems in vitro* (Franks and Wigley, eds.). Academic Press, New York.

[18] Stimmerhaves, I. C. (1979) Influence of donor a-c on *in vitro* transformation of bladder epithelium, p. 137-162. In *Neoplastic transformation in differentiated epithelial cell systems in vitro* (Franks and Wigley, eds.). Academic Press, New York.

[19] Wigley, C. B. (1979) Transformation *in vitro* of adult mouse salivary gland epithelium; a system for studies on mechanisms of initiation and promotion, p. 3-6. In *Neoplastic transformation in differentiated epithelial cell systems in vitro* (Franks and Wigley, eds.). Academic Press, New York.

[20] Au, W., Soukup, S. W., and Mandybur, T. I. (1977) Excess chromosome #4 in ethylnitrosourea-induced neurogenic tumor lines of the rat. J. Natl. Cancer Inst. **59**, 1709-1716.

[21] Laerum, O. and Rajaewsky, M. E. (1975) Neoplastic transformation of fetal rat brain cells in culture after exposure to ethylnitrosourea *in vivo. J. Natl. Cancer Inst.* **5-5**, 1177-1187.

[22] Stoica, G., Koestner, A., and O'Leary, M. (1985) Characteristics of normal rat mammary epithelial cells and *N*-ethyl-*N*-nitrosourea-induced adenocarcinoma cells grown in culture. *Anticancer Res.* **5**, 499-510.

[23] Krishan, A. (1975) Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *J. Cell Biol.* **66**, 188-193.

[24] Levan, G. and Mitleman, F. (1976) G-banding analysis in a serially transplanted RouS rat sarcoma. *Hereditas* **80**, 140-145.

[25] Wooranooj, U. and Hsu, T. C. (1972) The C- and G-banding *patterns of Rattus norvegicus. J. Natl. Cancer Inst.* **49**, 1425-1431.

[26] Yunis, J. J. (1981) New chromosome techniques in the study of human neoplasia. *Hum. Pathol.* **12**, 450-549.

[27] Buckton, K. E. and Evans, H. J. (1973) Methods for the analysis of human chromosome aberrations. *World Health Organization*, 18-22.

[28] Commitee for a Standard Karyotype of *Rattus norvegicus*. (1973) Standard karyotype of the Norway rat *Rattus norvegicus. Cytogenet. Cell Genet.* **12**, 199-205.

[29] Chen, T. R. (1977) In situ detection of mycoplasma contamination in cell cultures by Hoechst 33258 stain, *Cell Res.* **104**, 255-262.

第 24 章　ENU 诱导的卵巢癌

305

George Stoica

1　引言

人类与实验动物癌变的发生是包括了一系列形态表型改变的多步骤过程，这些改变可能导致恶性肿瘤的发生。为了更好地理解癌变过程中的某些机制，已在体内、外建立了多种实验模型。*N*-乙烷-*N*-亚硝基脲(ENU)对多种品系的大鼠都是直接有效的神经致癌物[1]。但有在经胎盘注射 ENU 到大鼠品系-Berlin Druckrey (BD-IV) 后，观察到这个品系对神经肿瘤的发展具有相对较强的抗性[2,3]。ENU 的作用在幼年 BD-IV 大鼠上研究较少。据报道，30 日龄的 BD-IV 雌性大鼠腹腔注射 ENU(90mg/kg)后，一种罕见的带有睾丸细胞特征(卵巢的 Sertoli 细胞癌)的卵巢肿瘤发病率会提高 50%，而对照组仅有 3%[4]。在 BD-IV 大鼠的所有癌变中，以卵巢癌发病率最高。

相似的肿瘤发生在人[5]和动物[6]都有报道，包括小鼠、大鼠、豚鼠、地鼠、母马、Indian Deshi 母鸡及猫。发生在小鼠、母马及 Indian Deshi 母鸡的卵巢肿瘤都具有雄性化特征。大鼠的这些肿瘤分泌大量性类固醇激素[4]。

Sertoli 细胞瘤被认为是一种性索基膜瘤，其组织发生机制尚不确定。一般认为，这种类型的肿瘤起源于卵巢门区域的多能干细胞。在组织培养中发现，这类肿瘤细胞具有上皮细胞的表型，与卵巢的颗粒细胞相似。尽管颗粒细胞是内皮细胞而不是上皮细胞(因为它们不位于体表或腔的外表)，但它们不形成血管，由位于基底腔的多层细胞形成，功能像上皮细胞，所以常把它们作为研究癌变发生的有效模型。

306

大鼠卵巢 Sertoli 细胞瘤的体外特征尚未见报道。ENU 诱导的 BD-IV(腺瘤)大鼠卵巢 Sertoli 细胞瘤来源于非激素诱导，目前已建立永久细胞系。

本章主要描述体外检测这些细胞向恶性瘤转型的方法，涉及生长需求、形态特征、DNA 含量、核型及移植的潜能。

2　材料

2.1　动物与处理

(1) 雌性 BD-IV 大鼠，30 日龄(Harlan Industry)。

(2) ENU 晶体(Fluka)。

(3) 磷酸盐-柠檬酸盐缓冲液(pH4.2)。

2.2　细胞培养物的分离

(1) 无菌解剖刀片。

(2) 剪刀。

(3) 帆布。

(4) Hank 缓冲液(HBSS)(pH7.0~7.2)。

(5) 三角瓶(50mL)。

(6) 酶溶液：DMEM(Life Technologies)，0.1% 胶原酶(Sigma)，1%青霉素-链霉素。

(7) 37℃旋转水浴锅。

(8) 尼龙筛(74μm)。

(9) 离心管(15mL)。

(10) 代培养液：DMEM，25%马血清(Life Technologies)，20ng/mL 氢化可的松(Sigma)，20ng/mL 胰岛素，20ng/mL 促乳素，青霉素-链霉素。

(11) 细胞系培养液：DMEM，10%马血清，谷氨酰胺，1%青霉素-链霉素。

(12) 0.25%胰蛋白酶，0.02% EDTA。

(13) 60mm 的培养皿。

(14) T75 组织培养瓶。

(15) 针(18G)。

2.3 流式细胞仪分析 DNA 分布

(1) Coulter Epics V MDADS 系统。

(2) 0.05mg/mL 的碘化丙锭，0.1%柠檬酸钠配制。

307

2.4 染色体分析

(1) 12.5μg/mL 秋水仙酰胺储备液。

(2) 甲醇、无水乙醇，分析级。

(3) 冰醋酸，分析级。

(4) 带橡胶吸头的巴氏管[见注意事项(3)]。

2.5 锚定依赖生长

(1) 琼脂液 I：DMEM，2% sea plaque 琼脂糖(FMS, Marine Colloids Division, Rockland, ME)，25%马血清，0.2%重碳酸盐。

(2) 琼脂液 II：DMEM，0.33% sea plaque 琼脂糖，25%马血清，0.2%重碳酸盐。

2.6 致癌性

(1) 戊巴比妥。

(2) 盐酸氯胺酮。

3 方法

3.1 动物与处理

接种 30 只雌性(30d，无特定病原菌的 BD-IV 大鼠)，皮下注射 90mg/kg 用磷酸盐-柠檬酸盐缓冲液(pH 4.2)新鲜配制的 ENU 晶体[4]。

3.2 细胞培养物的分离

(1) 接种 ENU 320d 后，分离 Sertoli 细胞瘤，该肿瘤的组织形态如图 24.1 所示。

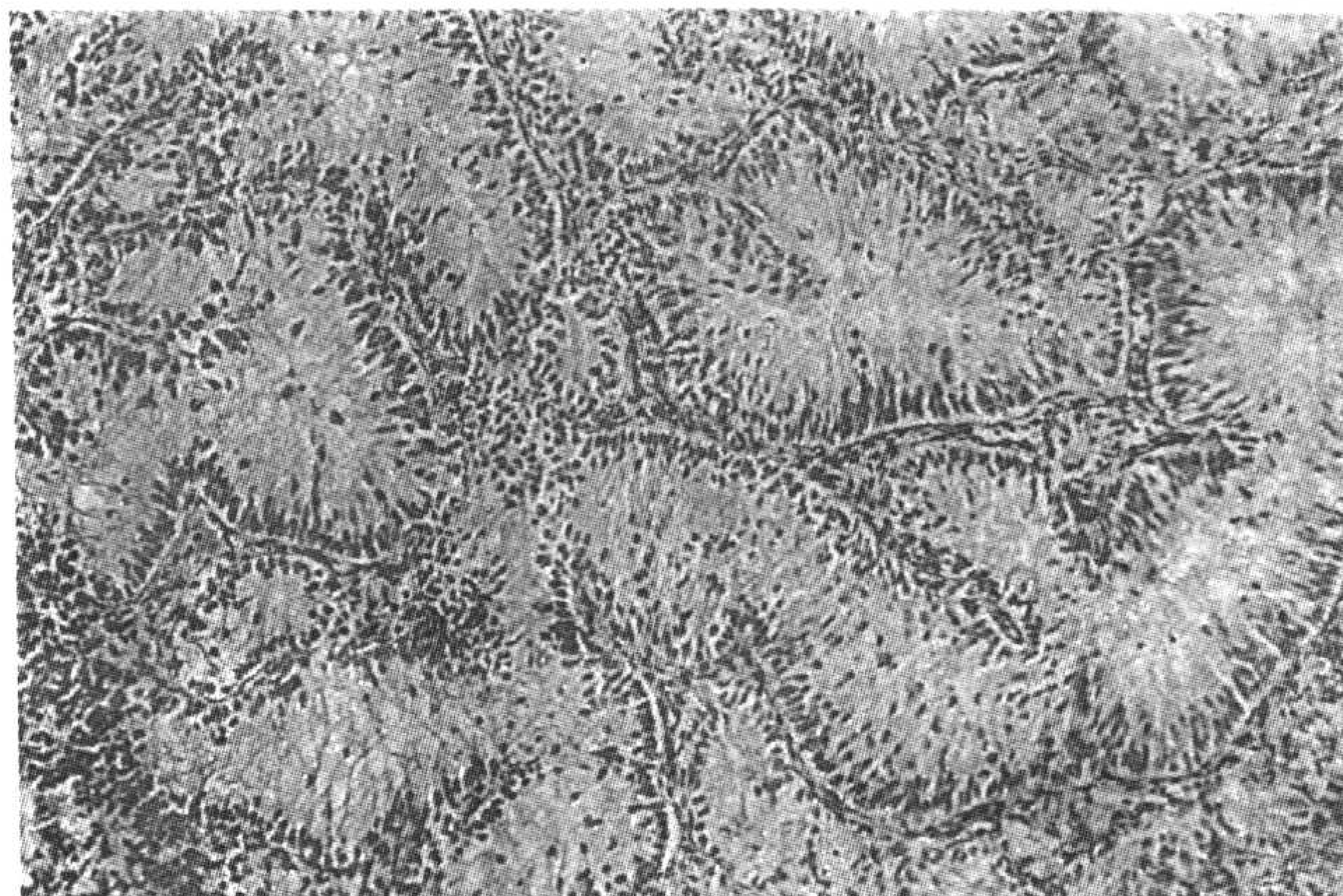


图 24.1 ENU 诱导 BD-IV 大鼠卵巢 Sertoli 细胞瘤的组织管状结构图

(2) 切下非类固醇激素诱导的 Sertoli 细胞瘤的中心组织(约50mg)，移至凹面玻璃皿上。

(3) 加入 0.5mL HBSS 缓冲液，用解剖刀剪碎组织。

(4) 新剪碎的组织放入盛有 25mL 酶溶液的 50mL 三角瓶中。

(5) 把三角瓶放入 37℃水浴锅中消化 40min。

(6) 用单层 74μm 尼龙筛过滤悬浮细胞。

(7) 100*g* 离心 2 次，去掉碎片。

(8) 加入 4mL 的培养液，重悬沉淀。

(9) 在 60mm 的培养皿上种植 5×10^5 个细胞，放入 37℃湿热 CO_2 培养箱中培养。CO_2 浓度为 6%。

(10) 确认细胞生长后，细胞移入到 T75 培养瓶中。

(11) 在以后的传代过程中(10 代以后)，Sertoli 细胞肿瘤系(SCTL-1)在细胞系培养液中维持生长。

(12) 用 0.25%胰蛋白酶加 0.02% EDTA 消化细胞，进行传代培养。

(13) 37℃胰蛋白酶消化 3~5min。

(14) 使用倒置显微镜观测培养细胞的形态(图 24.2)。

(15) 计算群体倍增时间是以细胞计数的常数对数乘以因子 3.33 的 $\log_2$ 来表示的。群体倍增时间的计算公式如下：

$$倍增数=\log_{10}(N/N_0)\times3.3$$

308

式中，N 表示生长末期培养皿中的细胞数量；N_0 表示培养皿中初期种植的细胞数量[7][见注意事项(4)]。

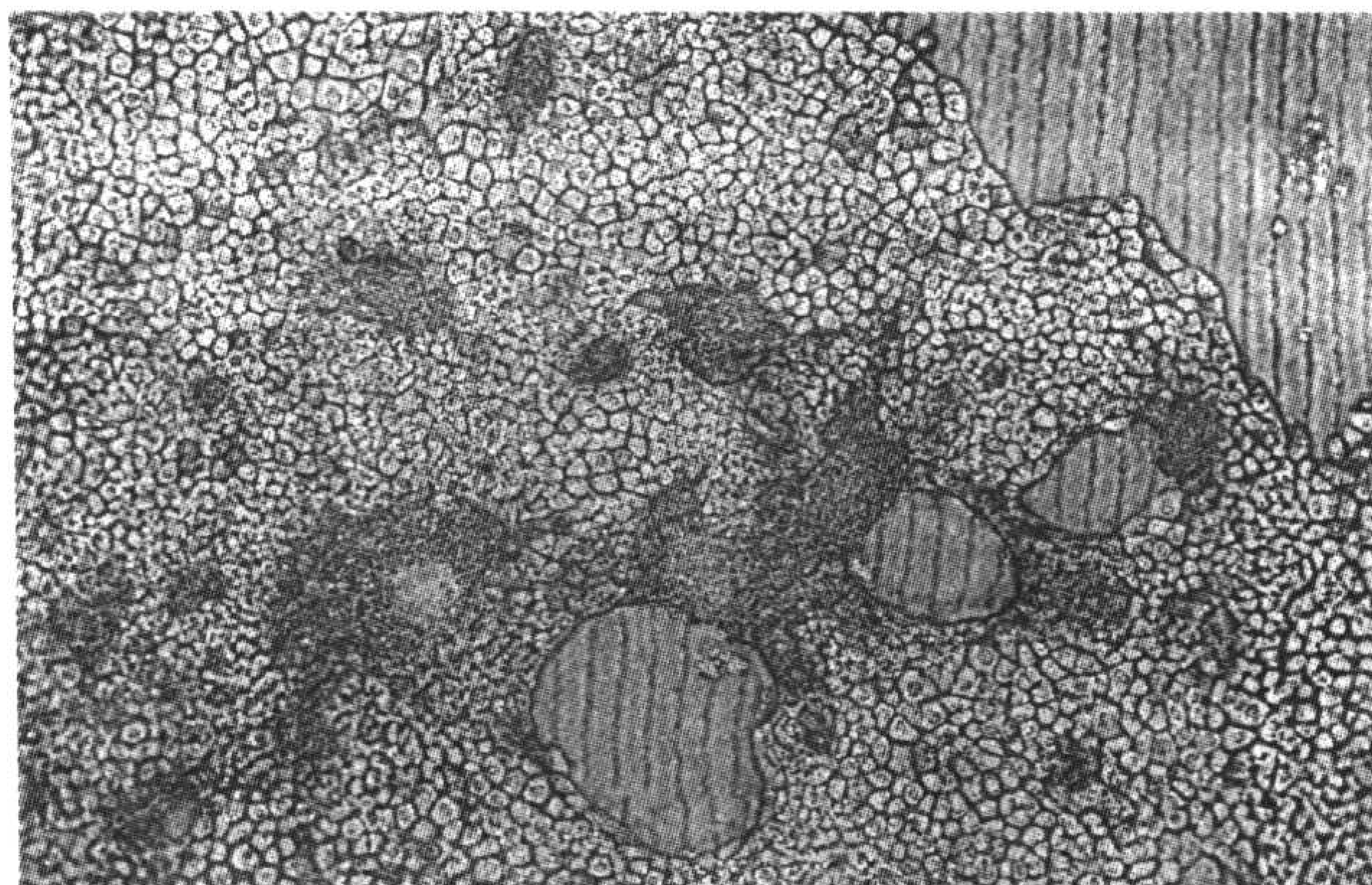


图 24.2　倒置显微镜下观察第 20 代 SCTL-1 细胞系，细胞紧密排列，形成单层，并且有鹅卵石样结构

3.3　DNA 分布的流式细胞仪分析

(1) 使用的材料为 1~20 代之间的非类固醇细胞系(SCTL-1)。

(2) 用注射器冲洗成单细胞悬液。

309

(3) 碘化丙锭的工作浓度为 0.05mg/mL，稀释液为 0.1%柠檬酸钠[8]。

(4) 用 Coulter Epics V MDADS 系统测量荧光。

(5) 用正常未处理的大鼠外周血淋巴细胞作为标准对照。

(6) SCTL-1 细胞系 DNA 含量的频率分布表如图 24.3。

3.4　染色体分析

(1) 材料为各个阶段 SCTL-1 细胞系(如第 2、10 或 20 代)。

(2) 在细胞对数生长期，在 T75 培养瓶中加入秋水仙酰胺(0.4mg/mL)，孵育 1h。

(3) 胰蛋白酶消化。

(4) 600*g* 离心 10min。

(5) 弃掉上清，加入低渗溶液(蒸馏水)[见注意事项(5)]。

(6) 悬浮沉淀，37℃孵育 15min。

(7) 甲醇：冰醋酸(3：1，*V*/*V*)固定 15min。

(8) 用细头巴氏管把悬浮细胞滴在载玻片上。

(9) 晾干[见注意事项(6)]。

(10) 采用 Yunis 的方法并略作改动，显示 G 带，胰蛋白酶消化 15s[9]。

(11) 被鉴定的染色体应与正常大鼠染色体相一致[10]。

(12) 在 SCTL-1 细胞系传代的各个阶段随机挑选出 50 张分裂中期的片子，拍照[见注意事项(7)及图 24.4]。

3.5　非锚定依赖生长

(1) 采用 MacPherson[11]描述的方法并略作修改，检测卵巢 Sertoli 细胞瘤在琼脂中形成克隆的能力。

(2) 在 60mm 培养皿中加入 5mL 琼脂 I 以形成基底层。

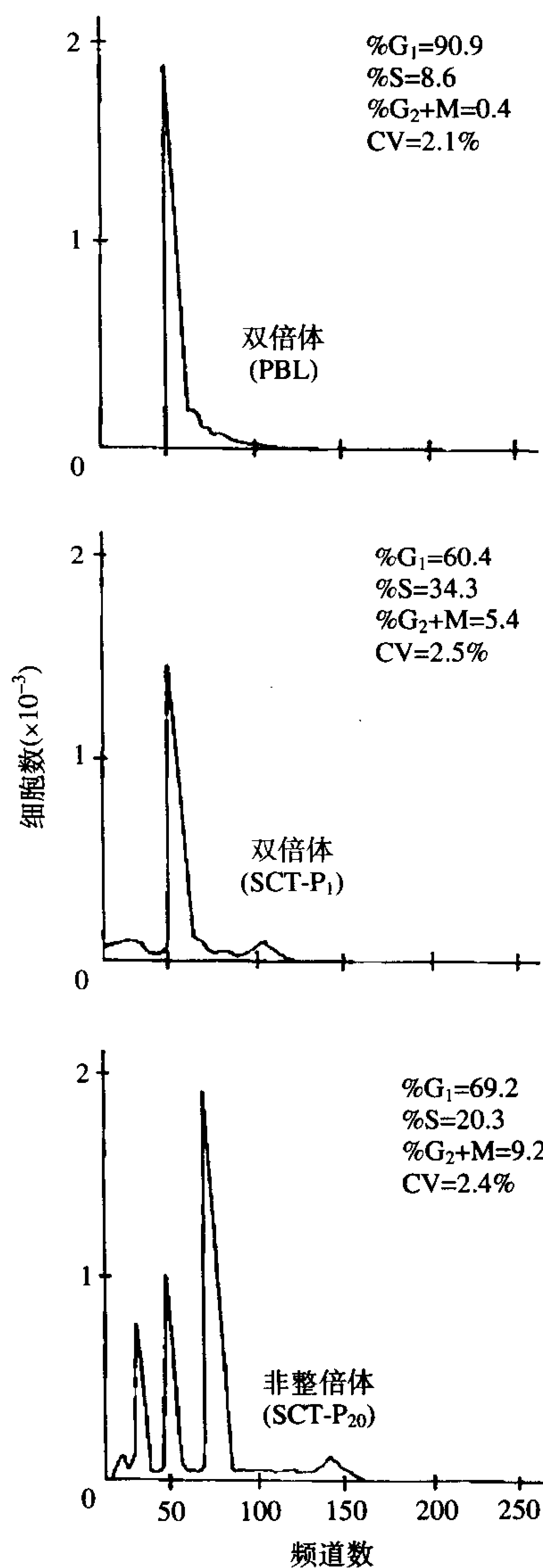


图 24.3　第 2 代 SCTL-1 细胞系 DNA 含量频率分布图

P_1，二倍体；P_{20}，非整倍体；PBL，外周血淋巴细胞(标准对照)。细胞 DNA 含量与信号通道数成正比

(3) 加入 1.5mL 琼脂 II 形成第二层，细胞浓度为 7.5×10^4 个/培养皿。

(4) 在 37℃,10% CO_2 培养箱中培养。　310

(5) 5~6 周后，在倒置显微镜下对大于 40 个细胞的克隆计数。

3.6　致癌性　311

(1) 新生大鼠腹腔注射，裸鼠皮下注射各代细胞，细胞数量为 1×10^6 个/0.2mL。

(2) 用最初几代细胞接种的动物，应在 4 个月之内观察。

(3) 10 代之后的细胞接种动物 2~4 周后开始形成肿瘤(图 24.5)。

(4) 4 周后，在麻醉的情况下处死动物(80mg/kg 戊巴比妥)。

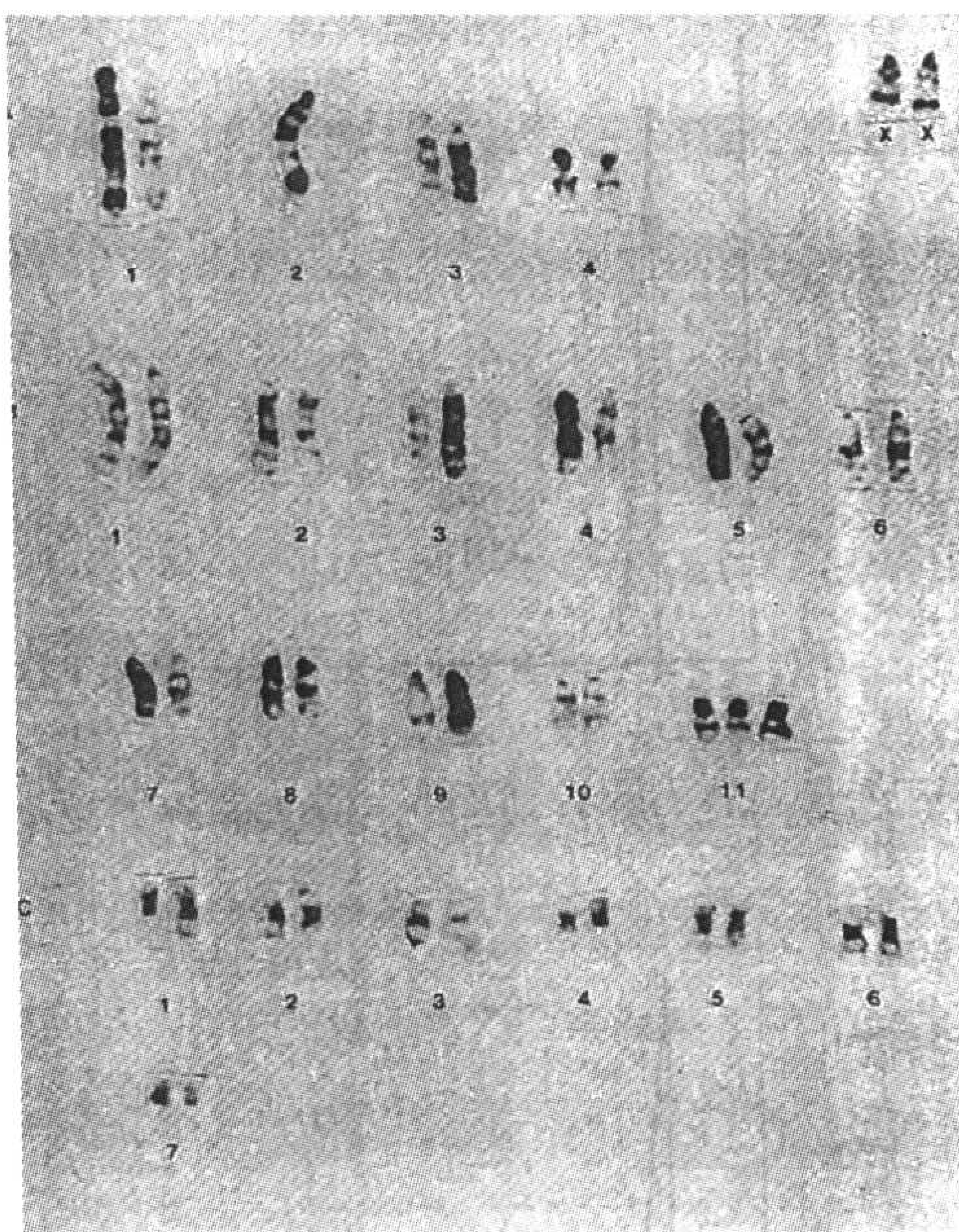


图 24.4　第 20 代 SCTL-1 的核型，G 带

30%分裂中期染色体非随机性突变显示：在亚端部动粒配对处缺失一条染色体，2 条染色体的额外配对，11 号染色体在亚端部动粒处出现第 3 条染色体

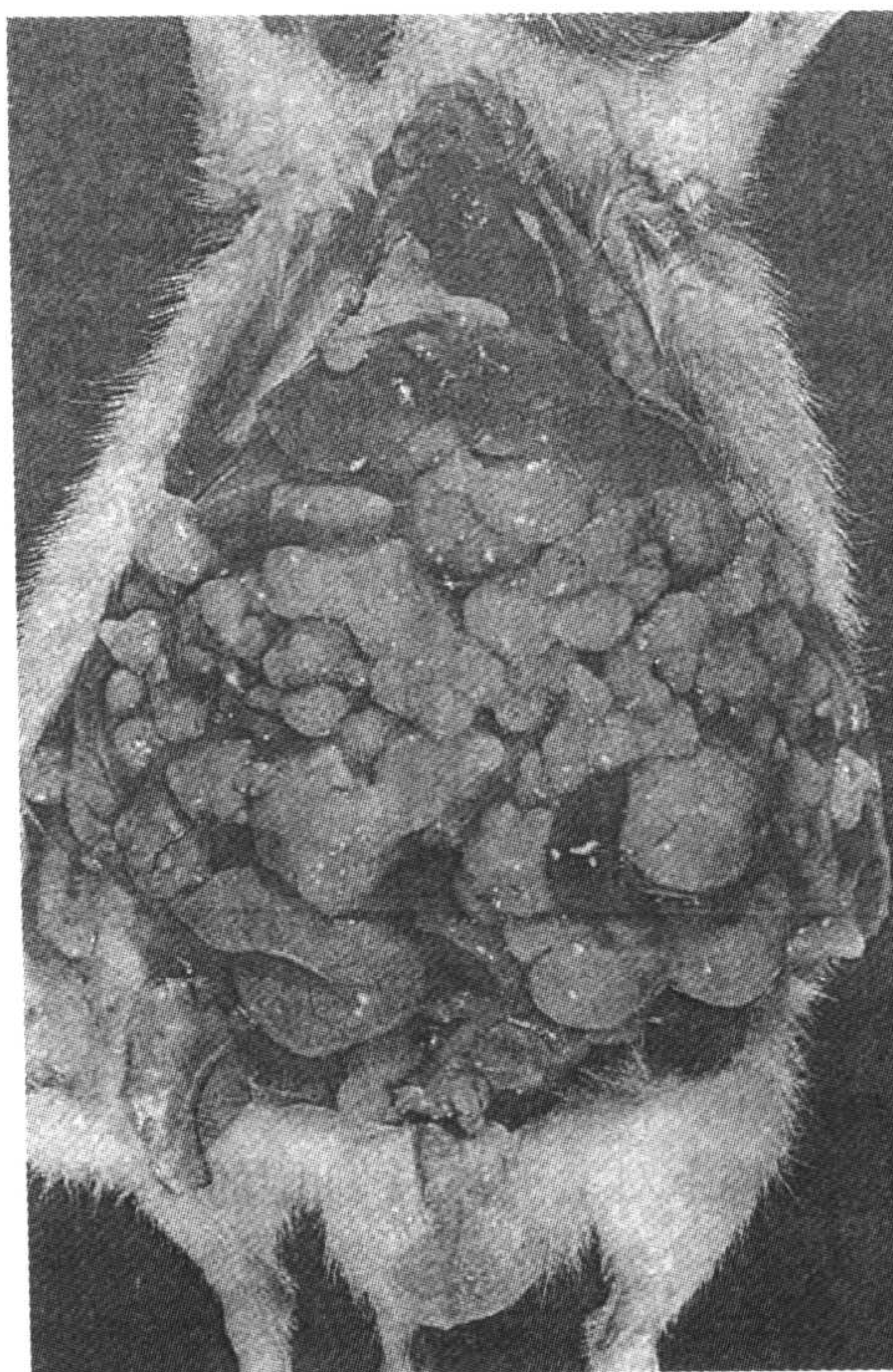


图 24.5　BD-IV 大鼠腹腔注射第 20 代 SCTL-1 细胞，4 周后腹腔散布的节状物

(5) 记录腹腔和皮下的肿瘤。

(6) 保存组织，以备以后进行组织学观察[见注意事项(7)~(9)]。

3.7 形态学研究

(1) 注射大剂量戊巴比妥(180mg/kg)处死实验大鼠。

(2) 对每一个动物进行完全尸检。

(3) 需要在常规显微镜下观察的组织应用10%福尔马林固定。 312

(4) 切片为4~6μm，用苏木精和伊红染色。

(5) Sertoli细胞瘤的形态学特征以前有报道[13]。

(6) 在倒置显微镜下检查组织培养物并拍照。

4 注意事项

(1) BD-IV大鼠来自G.Stoica博士的实验室，在Texas A& M大学实验动物房饲养。

(2) ENU是化学致癌物质。实验过程中的药品是有毒的，要在适当的保护措施下进行实验。ENU溶液的配制应在化学间内进行。操作者应戴手套、面罩，实验室应备有中和ENU的2%NaOH溶液、盛装器皿及制备溶液所需的其他材料。 313

(3) 为了使染色体更好地扩展，巴氏管腔内径要在Bunsen炉的火焰上烧得很细。

(4) 准备自然发生的永生非肿瘤大鼠(BD-IV)颗粒细胞系，鉴定其特征，以备将来实验用[12]。用猴病毒(SV-40)早期片段基因转染单细胞系(SIGC)，生产完全转染的细胞系，以供体外研究颗粒细胞体外肿瘤转化。

(5) 细胞膨大是非常关键的一步，是染色体充分展开的必要条件。各种低渗溶液均可应用，其中最常用的是0.075mol/L KCl，但在我们的实验中用的是蒸馏水，效果也很不错。每种细胞系的处理时间不同，15~20min足可以使细胞膨大。

(6) 低渗处理后的固定是另外一关键步骤。固定液要新鲜配制，并在低温下保存。推荐的实验方法是，首先去掉一半低渗液，慢慢加入固定液，以防细胞聚集。为了确保细胞固定，在晾干细胞前应更换固定液3~4遍。用巴氏管滴细胞时，要调整高度以寻求最佳位置。通过晾干载玻片来扩展细胞，干燥的时间因吹干或晾干不同而调整。

(7) 第20代SCTL-1细胞系的核型及G带分析结果显示细胞分裂中期30%的染色体发生非随机变异。这包括第二对亚端着丝染色体缺失一条、两对额外的染色体对及近端着丝染色体组出现11三体。

(8) 接种后SCTL-1大鼠的第一临床症状是腹部变大及腹水增多，接种的裸鼠表现是接种部位有皮下小结生长。

(9) 接种第10代细胞的大鼠或裸鼠4个月后仍不能形成肿瘤。用10代之后的细胞接种动物，2~4周后形成肿瘤。大鼠形成多个腹腔瘤，散布在腹膜、横膈膜及软组织器官的浆膜表面(图24.4)。通常情况下，这些快速生长的肿瘤可以在接种后4周内使宿主致死。这些移植肿瘤在组织学上是未分化的退化性癌。

(刘为敏 译　沈　政　王　莉　校)

参 考 文 献

[1] Rajewsky, M. F., Augenlicht, L. H., Biessmann, H., Goth, R., Husler, D. E., Lacrum, O. D., and Lomakina, L. Y. (1977) *Nervous-systemic-specific carcinogenesis by ethylnitrosourea in the rat: molecular and cellular aspects*, p. 709-726. (Hiatt, H. H., Watson, J. D., Winsten, J. A., eds.). CSH Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

314

[2] Druckrey, H., Landschultz, C. H., and Ivankovic, S. (1970) Transplacentare erzeugung maligner tumoren des nervensystems. II. Ethyl-nitrosoharnstoff ein 10 gene tisch definierten rattenstammen. Z. *Krebsforsch.* **73**, 371-386.

[3] D, Ambrosio, S. M., Su, C., Channg, M. J. W., Oravec, C., Stoica, G., and Koestner, A. (1986) DNA damage, repair, replication, and tumor incidence in the BD-IV rat following administration of *N*-Ethyl-*N*-Nitrosourea. *Anticancer Res.* **6**, 49-54.

[4] Stoica, G., Koestner, A., and Capen, C. C. (1985) Testicular (Sertoli's cell) like tumors of the ovary induced by N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) in rats. *Vet. Pathol.* **22**, 483-491.

[5] Ashley, D. J. B. (1978) *Evan's histological appearances of tumors, 3rd ed.*, p 663-672. Churchill, Livingston.

[6] Cotchin, E. (1977) Pathology of the female genital tract, p. 836-838. (Blaustein, ed.). Springer, Berlin.

[7] Pastan, T. H. (1973) Cell culture. Methods in enzymology, vol LVIII, p. 150. (Jakoby, ed.). Academic Press, New York.

[8] Krishan, A. (1975) Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodine staining. *J. Cell. Biol.* **66**, 188-193.

[9] Yunis, J. J. (1981) New chromosome techniques in the studies of human neoplasia. *Hum. Pathol.* **12**, 540-549.

[10] Unakul, W. and Hsu, T. C. (1972) The C- and G-banding patterns of *rattus norvegicus* chromosomes. *J. Natl. Cancer Inst.* **49**, 1425-1431.

[11] MacPherson, I. (1972) Soft agar techniques, p. 276-280. *Tissue culture methods and applications*. (Kruse and Patterson, eds.). Academic press, New York.

[12] Stein, L. S., Stoica, G., Tilley, R., and Burghardt, R. C. (1991) Rat ovarian granulosa cell culture: a model system for the study of cell-cell comunication during multistep transformation. *Cancer Res.* **51**, 696-706.

[13] Stoica, G. and O'Leary, M. (1988) In vitro malignant transformation of in vivo ENU-induced rat ovarian Sertoli cell tumor (adenoma). *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **114**, 142-148.

第 25 章　上皮细胞单层膜电容的测量

315

Carol A. Bertrand　Ulrich Hopfer

1　引言

生物膜作为生理屏障和电的绝缘体，将不同的含水结构分开，如将细胞内和细胞外的环境分隔开。用电学术语来讲，这种能分开富有导电性的水介质的膜相当于电容器。这个名词对生物学家们很有价值，因为电容器的容量与它的表面面积成比例。测量出膜电容，就能算出它的准确面积。对大多数生物膜，电容/面积的比例常数是 1μF/cm^2[1]。

在高等动物体内，相邻细胞产生紧密连接以后形成上皮细胞单层，这一单层成为不同细胞外结构间的重要的生理屏障和电绝缘体。这个屏障非常复杂，它由细胞及周围浆膜和特化的细胞间连接组成(图 25.1A)。在培养中，上皮细胞经常极化地生长在含有胶原或其他基质的薄膜上。相邻细胞的紧密连接将每个极化的上皮细胞浆膜分成两部分，一部分是自由面的顶端即腔面；另一部分是基侧面，即体内的营养(血液或浆液)来源侧。基底浆膜包含与基底薄层接触的表面和细胞间的侧面。细胞间隙是周围细胞间物质的运输通道，被称为侧细胞间隙(lateral intercellular space, LIS)(图 25.1A)。肉眼可见上皮细胞单层能够在液态结构间形成屏障，可以培养在有多孔滤器的插入物上。既然该单层的渗透性或导电性(垂直于单层表面的流量)与它的面积成比例，很自然地，根据滤器面积就能将相应单层的电容推算出来。在测量滤器面积时，须将它与浆膜顶端面积或基底面积区分开。

316

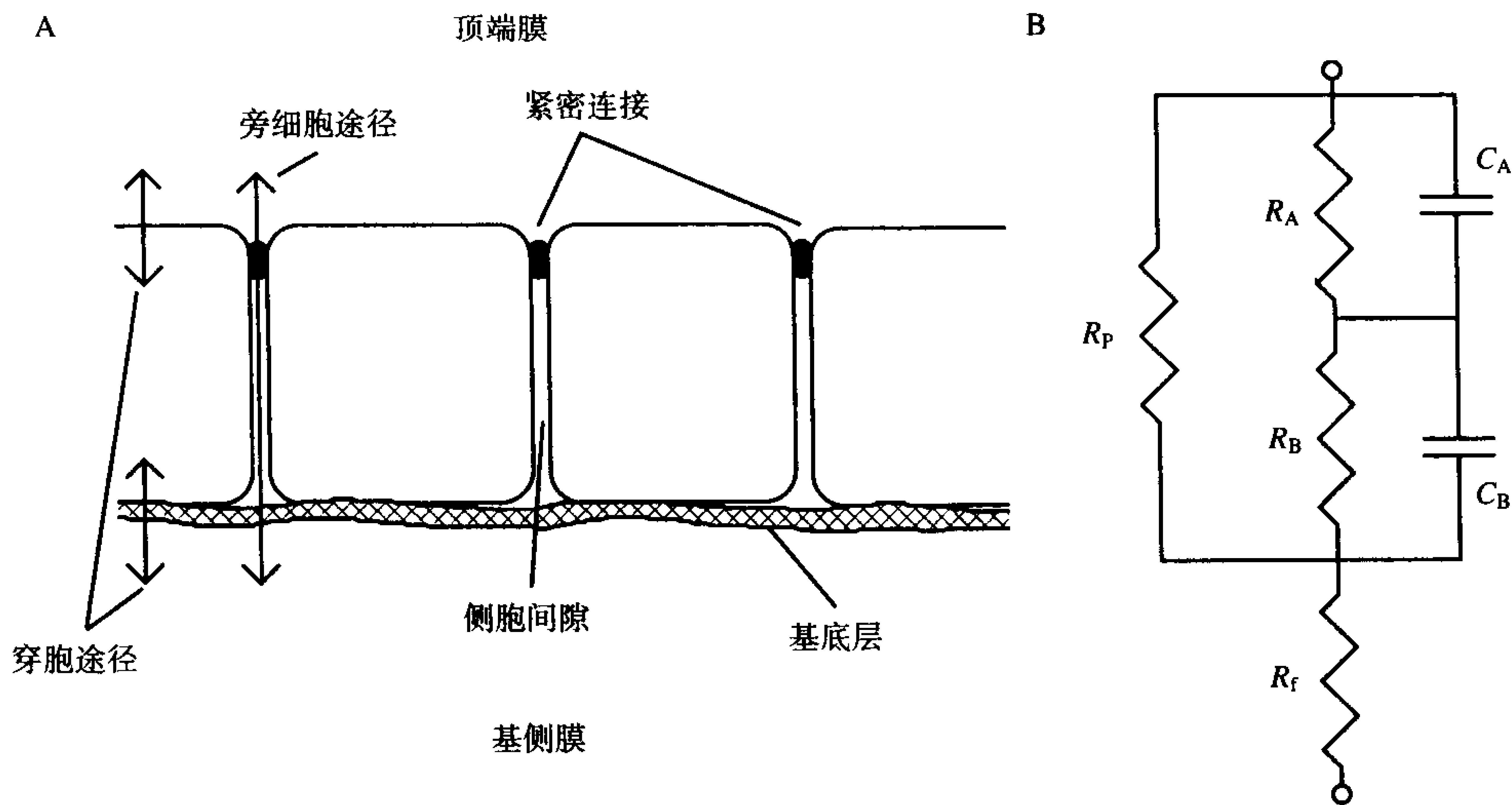


图 25.1　上皮单层的简化模型

(A) 顶部是顶端膜，底部是基侧膜。紧密连接连着每个细胞的顶端膜，在顶端膜和基侧膜间形成一道屏障。溶质和水通过跨细胞途径或旁细胞途径流动。基膜是一层细胞黏附的连接组织。在所有培养的上皮细胞单层中，这是一个典型的铺有胶原的多孔滤器。(B)完整的上皮细胞单层的集总模型。A 代表顶端，B 代表基侧面，P 代表细胞旁途径，R_f示细胞外液体电阻

测量膜电容或单层电容，只需应用基本的电生理设备来测量电压和电流信号在适当电刺激后的改变。在实验设计过程中，必须了解基本的跨上皮电生理知识[2]。这里所说的设备和操作流程对融合的上皮细胞单层来说是特殊的，因为必须用到外部非嵌入电极。317 利用这种方法，可以进行单层电特性的动力学研究，包括短程电流(I_{SC})、直流电阻(R_{DC})和单层电容。这种方法适用于 $R_{DC} \geqslant 200\Omega \cdot cm^2$ 的单层(显微镜下面积)。

单层膜面积可在静态或动态条件下测量。静态时的测量用来确定基底或顶端膜的具体面积；动态时的测量用来跟踪膜面积如胞外分泌和内吞时的变化值。这两者之间的主要差别在于测量的速度或测量时单层的稳定程度。最重要的一点是，在测量膜电容时，所有现有的方法都假设在测量周期中电容值保持恒定。如果这个条件不成立，即使测量系统运行正常，测量值也是错误的。测膜电容的不同方法揭示了描述单层和选择适当测量规程的复杂性，有些方法适合静态测量，其他的方法适合动态测量[3~8]。下面描述的这个技术主要适于测量膜容量的动态变化和快测量周期。

1.1 阻抗分析理论

膜电容测量技术更多地认为是全电阻分析，因为单层除电容以外还包含了离子通道和其他离子流动通道。这些成分共同形成电阻，显示出单层上电压与电流呈时间依赖或频率依赖关系。上皮单层是一个复杂的屏障，电阻分析的第一步就是要确定一个合适的模型来说明它的组成成分。这些模型用电阻器来代表通过单层的传导通路，用电容器来定义单层的膜。图 25.1B 为本系统所用的模型。在该模型中，用 3 个电阻器来描述通过单层膜的 3 个离子通道，即顶端通道、基底通道和旁通道。2 个电容器被用来描述横向的潜在的单层膜，即顶端膜和基侧膜。旁通道电阻(R_P)是两个独立变化的电阻，即紧密连接和细胞间隙电阻的总和。R_f 代表电极和单层间液体的电阻，它的值能直接测量出来。其他 5 个成分的值能通过测量计算出来。

模型的全电阻(Z_T)能由 5 个已知的成分和 R_f 准确的推算出来[见注意事项(1)]。它能318 用两个等效的方法描述，即时间或复频率的函数。复频率的表示方法将时间的导数转化为简单的相乘。单层受到适当的电刺激后，我们用即时和整个时间的电流和电压变化来计算出单层的电阻。

$$Z_X(s) = \mathrm{FFT}\,[V(t)/\mathrm{FFT}[I(t)]$$

式中，FFT 是快速傅里叶变换。确定了 Z_T 并测量了电压和电流的值后，Z_T 的参数用非线性最小方差分析就能确定。非线性最小方差分析是比较模型推导的 $Z_T(s)$和实测的 $Z_X(s)$之间的误差，为了减少误差，调整并确定每个 $Z_T(s)$参数的强度和方向，重复该步骤，直到得到最佳的拟合值。

在最大组分敏感范围内,刺激信号必须提供频率信息，并用短暂的持续期满足动态测量的要求。组分的敏感度用 $Z_T(s)$的偏导数，或雅可比行列式来确定[3]。其中每个参数均用近似值。典型的单层敏感度在 10Hz~10kHz 之间波动。为了确定一个短测量周期内频率的变化范围，刺激信号应该由不同频率的信号组成[5]。在短的时间间隔内产生宽频率的最简单方法是将两次刺激并为一个刺激信号。

1.2 实际阻抗分析

在电容测量中应用电阻分析应考虑到几个实际的问题。其中最重要的问题是估计出参数的数目。图 25.1B 描述的是具有完整结构的上皮单层的最简单模型，然而 5 个参数不可能都从跨膜测量中估计出来。我们遗漏了细胞内电势的信息，它是一个临界节点，涉及 5 个参数中的 4 个。这个局限性能通过电阻方程 Z_T 从数学角度加以说明。Z_T 与 3 个多项式系数[$N1$、$N0$ 和 $D1$，见注意事项(1)]有关，这 3 个系数依次包含参数的和和乘积。我们能估计出多项式系数，但需要额外信息确定所有的参数[见注意事项(2)]。在大多数情况下没必要确定这些参数，因为多项式系数 $N1$ 直接与总的单层电容有关。

图 25.1B 的 5 个参数模型详细地描述了细胞单层，$N1^{-1}$ 是顶端和基侧面电容的系列组合。因为这一系列组合，C_T 将由两个电容中的最小电容决定，以顶端膜电容(C_A)为代表。在基侧面膜电容(C_B)>$5\times C_A$ 的情况下，C_T 是测量顶端膜面积变化的最重要参数。这 5 个参数模型能充分描述了上皮细胞单层，因为它满足下列 3 个标准：① 这些参数不是电压、频率或信号刺激持续时间变化的函数；② 细胞单层是同源细胞群；③ LIS 对旁电阻的贡献不大(<10%)。

电力噪声在跨上皮测量中一直存在，它能引起电压和电流的表观值偏离实际值，产生噪声实验数据。从组分和或多项式值计算电阻是直接和明确的，但从噪声实验数据反过来推导多项式是很困难的，而且容易出错。即使估计的参数是准确的，噪声也会引起 Z_T 和 Z_X 之间产生一定范围的误差。从 3 个方面可以减少噪声的影响，首先，可以改善外在条件和设备条件；其次，进行多次测量取平均值来提高信噪比；再次，剩余噪声可以用每次测量频率的标准误 ($\sigma[s]$)来测量，这些值可以作为参数估计中的权重。权重被用来归一化由于噪声引起的 $Z_T(s)$ 和 $Z_X(s)$ 之间的误差值[9]。

$$\text{归一化的误差} = [Z_T(s) - Z_X(s)] / \sigma[s]$$

319

在一个动态系统中取测量值的平均值是为了在增加信噪比与维持短的测量周期间保持平衡。

当 I_{SC} 不等于零时，细胞单层上量得的电压值显示的是它的偏正值，这在动态测量中是很常见的。在测量周期中，I_{SC} 是一个有效常数，可能导致 $Z_X(s)$的直流部分产生误差。为了减少这个误差，R_{DC} 用一个小的脉冲来测量，它的值将代替 $Z_X(s)$中的直流值。这对简化该模型公式是有利的。

2 材料

2.1 基本的电生理设备

(1) 膜电容由配有数据采集卡的跨膜电生理设备测定。标准的膜电容测量设备由 Iowa 大学生物工程系生产的 558-C-5 型上皮电压钳和脉冲发电器以及分开的前置放大器组成。

(2) 带有传统 4 电极的 USSING-型室，配有水平安置的过滤插入器。

320

(3) 被屏蔽的电缆，用于连接各种信号，特别是 USSING 室、前置放大器和电压钳

间的信号。保持一个低噪声的环境对准确测量膜电容非常重要，建议用一个接地的工作区或法拉第箱。辅助设备如灌注泵可能也增加了噪声，如果条件允许应该把它单独分开。如果辅助设备的影响太大，最简单的办法就是在测量的过程中(近 5s)把它关掉。在正式实验前，经常用无菌 Millicell ERS 电压电阻表检测培养细胞单层的 R_{DC} 和电势。

2.2 电阻数据的获得

(1) 测量电容需要脉冲刺激和数据读取系统，这是标准的电生理设备无法提供的。558-C-5 型设备可以在外部控制，即用电压钳和在它与单层的界面配备尽可能少的外源硬件。构成测量系统最基本的组分有一个多功能的数据获得(A/D)卡、A/D 卡与 558-C-5 间的界面、一台计算机和控制卡的软件。A/D 卡用国产的 PCI-6024E(Austin，TX)较合适，连接到 A/D 卡的终端盒也可购买到。在 558-C-5 和 A/D 卡间有 4 根连接线，3 根是直接连的，第 4 根要经过一个滤波器和衰减子连接。电压钳测得的电压和电流被连到类似的输入口，脉冲发电器的外部开关被连到一台计算器上。脉冲刺激，由 A/D 卡上的计算器产生，在连到电压钳外部输入口前，经过低通量的滤过和衰减。滤波器和衰减器可应用标准组件进行组装，也可直接在市场上购买。个人计算机需要一个 PCI 插口来安装 A/D 卡，其他计算机需更小的插口。处理器速度和储存性能依赖软件设计和分析工作是否在同一台计算机上进行。

(2) 现在的数据获得软件尚未商品化，大多数使用者制订他们自己的程序[见注意事项(5)]。程序设定如下：数据获得系统总的抽样率是每秒钟 49 152 个样[见注意事项(6)]；用 2 个频道抽样，每个频道抽样率是总数的一半。收集点的总数是 4500 个，即每个频道 2250 个；在快速傅里叶变换中将用到 2^N 个点。脉冲刺激在抽取 400 个样后开始，持续 2 个样的时间，有效的刺激时间是 40.69μs。当收集了 4500 个点以后，数据就转换成电压，并储存在临时数组中。重复 8 次这种操作，扫描每次得到的数据并与前一次获得的数据累加。一旦完成，临时数组中的值就除以 8 来算出每次扫描的平均值。在每次扫描的过程中，颠倒频道的次序来减小由于有限样本引起的误差。一旦电阻测量结束，就可进行 R_{DC} 的测量。首先，产生一个脉冲来触发 558-C-5 脉冲发电器。这个脉冲只需 500μs 即可。启动 558-C-5 脉冲发电器后，558-C-5 延迟脉冲产生时间为 500μs，等于启动脉冲持续的时间。启动数据获得系统需要 1s(用的是一个偶电极的脉冲，总的时间就是 2s)。经过 800ms 的等待以后，数据获得系统就以每秒 80 个样的速度抽样。收集的总样数是 200 个，每个频道是 100 个。数据收集完后，这些值就转换成电压值，和电阻数一起储存在硬盘里。这个过程在一个可调节的时间间隔内被重复，最小允许间隔为 5s。这些原始数据将被储存，便于以后整理。

321

2.3 电阻数据分析

数据分析可以用商业的数学软件，如 MathCAD(Mathsoft，Cambridge，MA)或者 Matlab(Mathworks，Natick，MA)处理。程序能够读出原始的数据并计算 *FFT* 值，然后用权重的非线性最小二乘法计算参数值。在计算过程中会使用复数，如果存在能够绘图和简化重复工作的程序，将非常令人激动。值得注意的是，电子数据表的程序在处理数学问题上并不十分复杂，不需要用户编写另外的程序。

3 方法

一个新电容测量系统的性能必须在正式使用之前经过验证。这包括确定上皮符合模型的要求，测出噪声等级，减少噪声到最小范围，优化参数估计系统。这些初步的测试仅在设备、上皮和细胞系类型或环境改变后才需要。一旦系统测试完毕，典型的试验包括以下两步：① 收集应用上皮单层进行试验的数据；② 计算提取膜单层的参数和可能的膜电容。应用计算机及一些编程技巧交叉存取上述这两个步骤的数值可以实时提供膜电容。

3.1 预备试验

(1) 上皮在测量电容前，先经过传统方法处理[3]。

(2) 单层横切的电镜照片可以提供关于 LIS 外观和相对膜面积的信息，以及在特定步骤中它们受到的影响。 322

(3) 在特定的实验中跨膜电生理学会决定 R_{DC} 和 I_{SC} 的改变，结合膜穿透性试验就可以估计 R_A 或 R_B/R_C 的相对分布。这些数据可决定组分值的预期范围，从而有助于优化估计参数。

(4) 应用电阻器和电容器在预期范围内构建空载来进一步校验系统。

(5) 应用空载代替单层，收集如 3.2 所描述的数据进行噪声评估。明确所有仪器(加热器、灌流泵)的正常操作。

(6) 应用 3.3 中的步骤(2)处理数据。从标准偏差(σ)与频率的图示中可以发现存在的所有噪声问题。不论是否使用专门仪器,都需要重复试验来找到噪声源。优化上述操作，即使 2 倍或 3 倍频率处较大的σ将用权重加以解释，但σs 值必须小于 Zx (s)的 5%。

(7) 参数评估体系可以通过已知数据在两个水平上进行检验和优化：这些数据包括应用公式获得的数据和空载得到的数据。因为公式获得的数据是无噪声的，这主要用于检验算法执行是否正确。空载数据用于评价噪声的影响和运算的正确性。利用噪声数据时，必须考虑参数评估所能运行的解的范围限制。限制条件的设计基于物理定理和上皮细胞预试验：① 参数必须为正值；② R_P 或 R_A+R_B 都必须小于 R_{DC}；③ C_A 和 C_B 必须大于肉眼可见的细胞单层的面积；④ C_A 小于 C_B。初始猜测可以影响评估成功与否，变化范围可通过空载数据决定。一般的试验，仅第一轮数据设置需要初始猜测，后继的数据设置可以选择最后一轮的设置结果作为起点。

(8) 常规参数评估需要一个容差标准来决定参数何时成功确定。噪音数据要同时使用相对和函数容差。相对容差特指在 $Z_T(s)$和 $Z_X(s)$之间允许出现的差异，而函数容差特指在连续参数预测中的差异。两者的值都应该小于 10^{-5} 或更小。在一系列参数评估后，需要评估数据的完全拟合[9]，包括应用给定的参数检验 $Z_T(s)$和 $Z_X(s)$之间的残数和误差。加权残数的平方和应该近似于残差数目减去最佳拟合的参数数目。加权残数应具备正常分布，连串检验不会在残差分布与频率之间发现有模式存在[10]。如果连串检验或分布一致偏离空载数据，就要怀疑膜片钳或者处理过程存在偏差，并且应该加以校正。如果单 323
层数据发生偏差，就表明该模型不能正确描述上皮。这可能发生在特定方法中的某些特

异点，例如，当单层参数在测量间隔中变化太快时，就会出现这种情况。任何一种检验如果无法获得预测结果都将是缺乏统计学意义的。

3.2 收集数据

(1) 确保实验用单层的 R_{DC} 足够大(肉眼可视面积≥200Ω·cm^2)。

(2) 在将单层插入 Ussing 室前，需要先测量使用溶液的流体电阻(R_f)并且弥补电极分支。R_f 可由 558-C-5 记录，但在实验期间流体电阻部分须设为零。

(3) 558-C-5 膜片钳的时间常数设为 0.5ms，脉冲发生器周期 50s，持续 1s，振幅 2.0mV，双极制式。

(4) 在 Ussing 室内安装单层。

(5) 应用短程膜片钳，保持 I_{SC} 和 R_{DC} 稳定，在实验中用条形图监测 I_{SC} 比较方便，因为这样可避免硬件和软件与电容测量体系发生冲突。

(6) 将 558-C-5 脉冲发生器的周期设为手动调节，启动电容测量体系。

(7) 在数分钟内至少测量 10 次基础条件下的值用以计算噪音加权值(如测量间期为 30s)。

(8) 按照要求进行下一步试验，如刺激胞外分泌。在此阶段用电容测量软件控制膜片钳，连续取样，在规定的间隔内保存数据，使用者不必介入。

3.3 参数评估

(1) 计算每轮数据的 $Z_X(s)$ 和 R_{DC}(首先将两次独立测量值分开处理，在获取数据时将其组合成一组数据)。

(2) 为了计算 $Z_X(s)$，做 $V(t)$ 和 $I(t)$ 的快速傅里叶变换，并用 $I(s)$ 除以 $V(s)$。在理想的条件下，作 FFT 时数组的元素应为 2^N 个[9]；$V(t)$ 和 $I(t)$ 应该去掉起始的 196 点和最后的 6 点使总长度由原来的 2250 点变为 2048 点。注意前 196 点是脉冲刺激前产生的。$Z_X(s)$ 是一个 1025 元素的复数数组，包括一个零(DC)元素和 1024 个频率元素，其范围为以 12Hz 为增量从 12Hz~12kHz[见注意事项(6)]。用偶极脉冲的稳定部分中出现的平均电压和电流值计算 R_{DC}；在计算平均值时，使用正负偏移消除误差：

$$R_{DC}=\left|(\Sigma V^{+}-\Sigma V^{-})/(\Sigma I^{+}-\Sigma I^{-})\right|$$

用 R_{DC} 值取代 $Z_X(s)$ 中的零元素，以消除其偏差。

(3) 使用相应的 $Z_X(s)$ 数组计算 10 个基线测量值的标准偏差，并且加权赋值。

(4) 在第一轮数据设置一个合适的起始猜测值。评估程序中需要 $N1$、$N0$、$D1$ 的猜测值。因为初级信息通常以分量值存在，因此根据注意事项(1)计算相关系数。起始猜测值的可行性依赖于被研究组织的类型。在决定起始猜测值时，将数据进行人工拟合是非常有益的：在调试参数值时，需比较 $Z_X(s)$ 和 $Z_T(s)$ 曲线。起始猜测值可能为：C_A=1.5×可视面积；C_B=10×C_A；R_P=2×R_{DC}，R_A=R_B=R_{DC}。组分间的近似的相对比率应该从以前的测试中了解到，并且对应的被替换。

(5) 应用 Levenberg-Marquardt 非线性加权最小二乘法计算所有组数据的参数 $N1$、$N0$ 和 $D1$[9]。复组抗(complex impedance)的实部和虚部必须被使用，而且各组分也可联合

起来。此外，步骤(2)中计算的加权值和初级实验得到的极限也应包括在内。一些打包程序算法可以提供估计模型公式 Jacobian (偏导数)的选择，而不是让用户去推导和补充。如果给定真实 Jacobian (偏导数)则运算可能更快，误差可能更小；使用符号处理器按注意事项(1)的 $Z_T(s)$公式计算这些数据。如果已知一组参数值，Jacobian 能显示出多项式参数最灵敏的频率范围。如果经历一段频率后参数仍没表现出灵敏性，那么即使再高的频率数据也不会提高数据匹配的质量。在最佳状态下，运算程序可以将所有组数据运行一周，每一组的结果都传递到下一组数据作为其起始猜测值。

(6) 验证 3.1 步骤(8)所描述的拟合值(fit)。得到 C_T 和 R_{DC} 与时间的曲线图。

(7) 应用 $Z_X(s)$数组可以作出任一组数据阻抗的 Nyquist 和 Bode 图，它们的绘制并不需要参数评估结果。此外它们也可用于评定附加过程，如范围分析和参数计算的正确性。

(8) 如果收集的是一个分量的附加信息[见注意事项(2)]，则其余的可用多项式系数方程来解决[见注意事项(1)]。当 Nyquist 图示为两个明显的半圆或圆柱时，该过程将尤为正确。在上述情况下，顶端参数和基侧参数是截然不同的。

(9) 注意在 Nyquist 图中如果独立半圆数超过两个，则表明模型不充分。

(10) 注意适用于已知分量的任何容差都必须适用于应用该值计算的所有分量。在动力学测量期间，应该假设任何组分都保持不变。

4 注意事项

325

(1) 本模型使用的公式如下所示[3]。注意膜紧密连接处没有电容，因为它的大小相对于膜顶端是可以忽略不计的。R_{DC} 的测量可以将未知参数减小到 4，也可以将单一多项式参数的数目减少到 3。

$$Z_T(s)=(N1\times s+N0)/(s^2+D1\times s+[N0/R_m])+R_f$$

其中

$$N1=(1/C_A)+(1/C_B)$$

$$N0=([1/R_A]+[1/R_B])(1/C_AC_B)$$

$$D1=N1\times([1/R_m]-[1/\{R_A+R_B\}])+(1/R_AC_A)+(1/R_BC_B)$$

$$R_m=([1/R_P]+[1/\{R_A+R_B\}])^{-1}=R_{DC}-R_f$$

(2) 评估组分值时，应至少知道一个组分的值，这可以通过辅助性测量，如膜穿透[11]、细胞间微电极测量法[6,7]或猜测过程来完成。然而这些技术应用于动力学实验却存在很多问题，因为在实验过程中需要参数进行改变。如果辅助性实验在实验将结束前进行，实验者必须验证结果在动力行为期间是否适用。在实验过程中使用辅助性测量会干扰单层的正常反应。应用范围分析通常可以获得单个参数的有益信息[3]，而该分析可不必运用辅助性测量直接进行。

(3) 558-C-5 的替代品需满足下列条件：电压钳应至少具有一个外部命令输入装置和一个电压和电流测量值输出装置。它必须在直流到 10Hz 的范围内具有相当恒定的频率反应，例如，测量的电压与电流的比值在整个频率范围内必须等于一个恒定电阻。电压钳还应具备一个脉冲发射器，在测量 DC 值时能外部启动。另外，脉冲发射器的功能也可以由控制 A/D 卡的软件完成，它将代替外设对外部命令信号产生反应。如果应用软件

操作，为了改变 R_{DC} 的脉冲幅度还需要补充硬件接口。更换电压钳时，注意彼此之间存在的差异，也就是说，输入、输出信号的比例尺及对外部启动反应的延迟时间。558-C-5 上的所有信号放大比例都是 10×。

(4) 558-C-5 前面板 BNC 连接器和 PCI-6024E 连接器间的连接方式如下：E OUT 连接到模拟输入通道 0(ACH<0，8>差异输入)，连接器插头 68(+)和 34(–)。I OUT 连接到模拟输入通道 1(ACH<1，9>)，连接器插头 33(+)和 66(–)。其余未用的模拟输入通道应该接地以避免传送虚假噪音，将插头 23-32、57-61 和 63-65 连在一起。将 TRIG IN 连接到计数器 1 的输出端(GPCTR1_OUT)，插头 40(+)，39(接地)。刺激信号从计数器 0(GPCTR0_OUT) 输出，插头 2(+)，36(接地)。上述信号的名称及插头号见于 PCI-6024E A/D 卡附带文件的原理图。

326

(5) 笔者已将运行基本测量步骤的程序代码(Visual C++)贴在以下网站上(http://physiology.cwru.edu/~hopfer/model.htm.)。代码的编写依据国家仪器纲要(NIDAQ)，该纲要主要提供编写 A/D 卡程序的操作程序。程序编写时，首先依据 NIDAQ 操作程序产生一次延迟计数器脉冲，进行一次扫描的模拟获取，然后通过将每次模拟获取产生的信号 SCANCLK 赋值给刺激脉冲计数器的时钟而获得同步。计数器在模拟获取开始前处于等待状态，然后在每次模拟获取的持续过程中同时产生一次脉冲。同步允许取连续扫描测量值的平均值以降低噪音。由于这种依赖性的存在，因此，刺激脉冲的幅宽应由模拟获取的扫描速度确定，该值非常重要，因为它可以决定适于单层的频率。获得电阻数据后，运行一次启动脉冲，进行 R_{DC} 数据的获取循环。

(6) 使用 49 152 个样本/s 的样本速率以获得 12Hz 的频率间隔，从而导致频率样本处于 60Hz 动力体系的基本和调谐组分。在动力体系中将频率和加权评估联合起来进行取样能使动力线噪音降至最低。样本速率应该根据不同的动力线系统进行调整，例如，50Hz 的动力线样本速率为 40 960 个样本/s。此外，刺激脉冲的幅宽也应进行相应的调整(在 40 960 个样本/s 的样本速率中，两个样本的一个刺激脉冲=48.8μs)。

致谢

感谢 Mike Butterworth 博士和 Chris Sciortino 博士在准备初稿时给予的有益建议。本研究由 Cystic Fibrosis 基金和国立健康培养基金 No. T32 DK07678 支持。

(戴博杰　李　晶 译　黄文耿　王　莉 校)

参考文献

[1] Cole, K.S. (1968) *Membranes, ions, and impulses*. University of California Press, Berkeley.

[2] Lewis, S.A. (1996) Epithelial electrophysiology, p.93-117. In *Epithelial transport: a guide to methods and experimental analysis* (Wills, N., Reuss, L., and Lewis, S.A., eds), Chapman & Hall, London.

327

[3] Bertrand, C.A., Durand, D.M., Saidel, G.M., Laboisse, C., and Hopfer, U. (1998) System for dynamic measurements of membrane capacitance in intact epithelial monolayers. *Biophys. J.* **75**, 2743-2756.

[4] Clausen, C. and Fernandez, J.M. (1981) A low-cost method for rapid transfer function measurements with direct application to

biological impedance analysis. *Pflügers Arch.* **390**, 290-295.

[5] Clausen, C. and Wills, N.K. (1981) Impedance analysis in epithelia, p.79-92. In *Ion transport* (Schultz, S.G., ed.), Raven Press, NewYork.

[6] Kottra, G. and Frömter, E. (1984) Rapid determination of intraepithelial resistance barriers by alternating current spectroscopy II: test of model circuits and quantification of results. *Pflügers Arch.* **402**, 421-432.

[7] Kottra, G. and Frömter, E. (1984) Rapid determination of intraepithelial resistance barriers by alternating current spectroscopy I: experimental procedures. *Pflügers Arch.* **402**, 409-420.

[8] Lewis, S.A. and Alles, W.P. (1984) Analysis of ion transport using frequency domain measurements. *Curr. Top. Membr. Transport* **20**, 87-103.

[9] Press, W.H., Flannery, B.P., Teukolsky, S.A., and Vetterling, W.T. (1986) *Numerical recipes: the art of scientific computing*, frist ed. Cambridge University Press, Cambridge.

[10] Straume, M. and Johnson, M.L. (1992) *Analysis of residuals: criteria for determining goodness-of-fit.* Methods in enzymology, vol. 210. Academic Press, New York.

[11] Wills, N.K., Lewis, S.A., and Eaton, D.C. (1979) Active and passive properties of rabbit descending colon: a microelectrode and nystatin study. *J. Membr. Biol.* **45**, 81-108.

329

第 26 章 应用光谱学评估上皮细胞融合

Simon A. Lewis

1 引言

组织支持物上生长的上皮细胞的应用前景日益广阔。这个组织培养体系用于研究两套膜系统中蛋白质和脂类分检的细胞机制，其中包括对极化上皮细胞、运载子组装的分子机制以及转运相关蛋白的研究。所有这些研究都需要一个必要条件，那就是培养的细胞必须融合并形成紧密连接。

紧密连接的形成是接种后时间的函数，可以被很多技术评估。所有这些技术都依赖于检测被选物质从组织培养的一侧(如腔侧)转移到相反一侧(浆侧)。采用方法应该是非侵入性的，同时要求操作、测量简单，准确，成本低而且尽量不污染细胞。鉴于此，就排除了放射性同位素的方法，因为它价格高、易污染细胞(因为需要从两侧多次取样并洗去同位素)，另外，长期的电离辐射可能会改变细胞中基因的表达。最常用的方法是电的方法。简单地说，就是用一股直流电(ΔI)穿过上皮，测得产生的电压(ΔV)。再用欧姆定理计算出细胞的导电能力$\Delta I/\Delta V$。这个方法既快捷又简单，但是它不准确，而且增加了污染的可能性。增加污染机会主要是因为在腔面和浆面放置电压表和电流通过的电极造成的。

330

测量的不准确是由于电流流经电极的电源特征引起了不一致的电场所致(更详细的说明参照参考文献[1]中的图 7)。不准确程度取决于电压表的电极和电流计的电极的插入位置。值得一提的是，跨上皮电导代表紧密连接的电导，与跨细胞电导相似。因此，跨上皮电导是对紧密连接电导的过高估计。另外，跨上皮的导电性是对小离子而不是对低浓度大分子穿上皮细胞能力的评价。

本章的目的是详细地描述一种简单、经济的测定上皮细胞单层紧密连接形成的方法。另外，由这个方法获得的数据可用来计算流过上皮的液体流量。

本章尝试介绍了以酚红为上皮细胞融合指示剂的方法，而且介绍了应用这种方法的前提条件。此方法的优点是快速、价格低、污染小，缺点是时间分辨率低(尤其对于低传导性的上皮)。

2 材料

这个方法的基本原则是测量在上皮细胞形成的两层结构间物质的移动。用于检测紧密连接形成的物质需符合以下标准：① 该物质对上皮细胞无毒性；② 组织细胞本身不能代谢或合成这种物质；③ 在培养系统中，该物质的存在与否不应该影响细胞的生长和活力；④ 该物质的检测系统必须简单，有一个高的信噪比，而且对该物质有高度选择性。酚红满足以上的大部分标准。酚红是 pH 指示剂，几乎用于所有商品化的组织培养液中。至今尚未见到酚红对上皮细胞有毒害的报道。无酚红培养液不影响细胞紧密连接的形成

或 A6 上皮细胞的生长(S.A.Lewis，私人交流)，上皮细胞不代谢或合成酚红(没有报道)，同时酚红不影响细胞的生长或活力。溶液中酚红的浓度可以通过分光光度计测溶液的吸光度来确定，然后用酚红的吸光度除以消光系数。这样，通过检测已知浓度酚红的吸光度就能制备出酚红吸光度对浓度的标准曲线，然后根据这个曲线和样品的吸光度来确定样品中酚红的浓度。 331

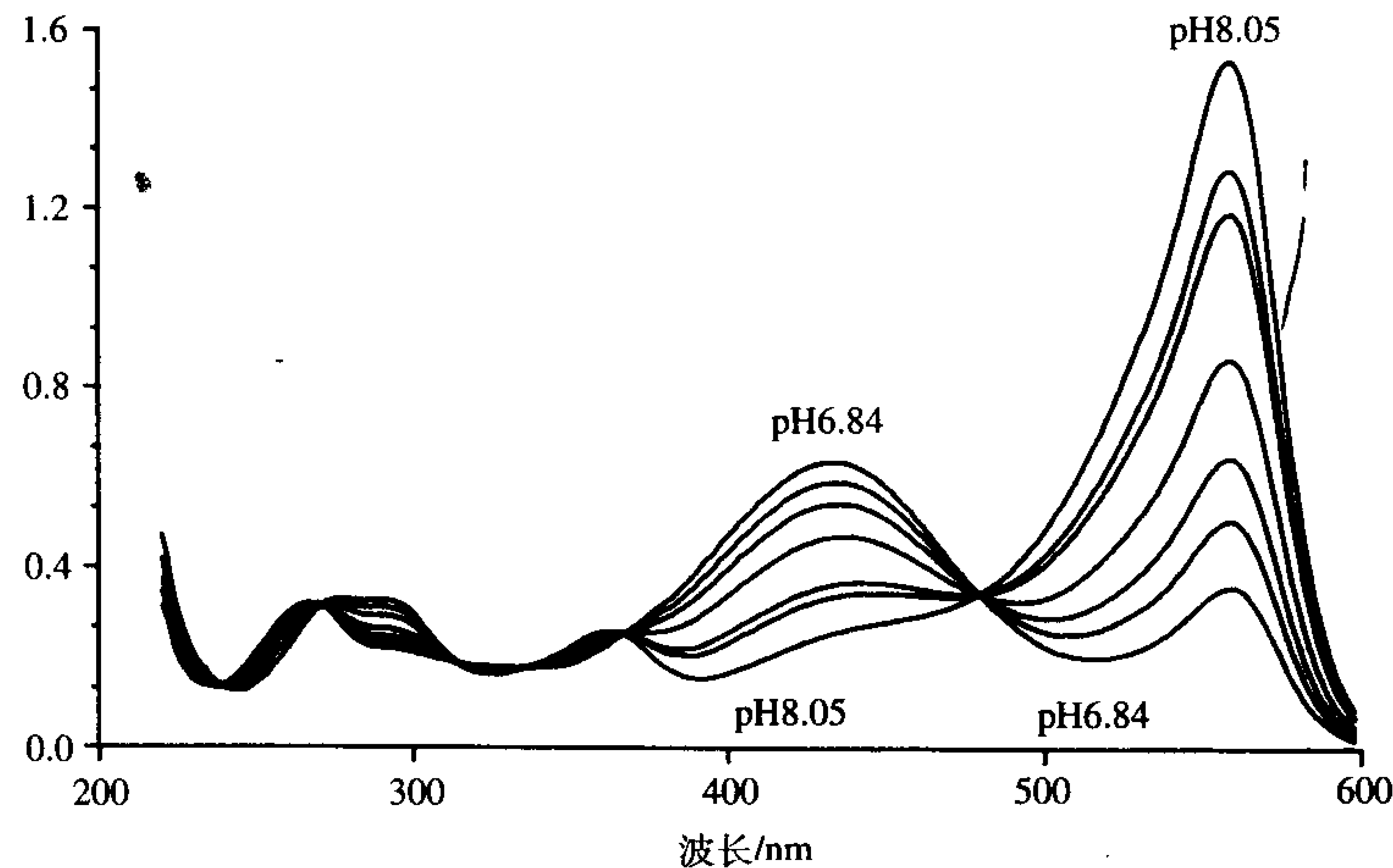


图 26.1 pH 对于酚红吸光特性的影响

注意, pH 能够在除了 479nm 的所有可见光波长(波长大于 390nm)下改变吸光度。479nm 是测量腔内溶液吸光度时采用的波长。吸光度用 LKB Ultraspec 的 LKB 扫描程序测量(经 Am. J.Physiol 允许，摘自 Jovov 等 1991 年的文章[1])

因为酚红是一个 pH 指示剂，它的吸光度是溶液 pH 的体现。如图 26.1 显示了不同的 pH 溶液中测量到的酚红的吸收波长。有趣的是，在可见光内波长为 479nm 时，酚红的吸光度对溶液的 pH 不敏感，这是一个等吸收点。为了消除 pH 对吸光度的影响，所有的测量均应在 479nm 处进行。酚红在此波长下的消光系数(吸光度对浓度的常数)是 8450L/mol/cm。已知消光系数后，用带有已知光径长度比色杯的分光光度计测得溶液吸光度，就可推算出酚红的浓度。典型比色杯的光径长度有 1cm 和 0.5cm，光程越长，测得的吸光度就越大。

人们越来越重视信噪比的问题。当波长超过 450nm 时，含酚红的组织培养液的吸收波谱与含相同浓度酚红的盐溶液的波谱是一致的，另外，上皮细胞不产生在 479nm 有明显吸光度的任何物质。因此，信噪比在 479nm 时对酚红的测量是非常有利的。

2.1 细胞培养

332

(1) 改良的 DMEM：DMEM 另添加 8mmol/L $NaHCO_3$，40mU/mL 青霉素，40μg/L 链霉素和 10%的胎牛血清(FBS)。培养液含酚红。

(2) 不含酚红的溶液：可选择以下配方中的任意一种。

a. 含有 NaCl 的溶液：74.4mmol/L NaCl, 5.36mmol/L KCl, 1.36mmol/L $CaCl_2$, 1.66mmol/L $MgSO_4$, 8mmol/L $NaHCO_3$, 0.91mmol/L NaH_2PO_4, 5.55mmol/L 葡萄糖, 1mmol/L 丙酮酸钠, 1mmol/L HEPES, pH7.4。

b. 不含酚红的 DMEM，即改良的 DMEM 溶液。

(3) A6 细胞：从爪蟾中分离的肾上皮细胞。

(4) 一次性塑料试管(也可以用石英管)。

(5) 透性支持物：HA 型微孔过滤器、CM 型过滤器和 Anocell。

3 方法

3.1 细胞培养

这部分将逐步介绍细胞培养方法。

(1) 把 A6 细胞接种在透性的支持物上[2]，培养在改良的 DMEM 溶液中。

(2) 在组织培养箱中让细胞黏附，并开始生长。

(3) 培养液中含酚红，应测出它的吸光度。

(4) 培养 24h 后，吸出上层的腔面培养液。

(5) 用不含酚红的溶液洗上皮腔面 4~5 次。

(6) 在不含酚红的溶液中孵育 10min。

(7) 在此 10min 内，酚红将从浆侧渗透到腔面。

(8) 10min 后，吸出腔面液体和浆面液体。

(9) 将腔面液体和浆面液体分别放在不同的比色杯中，用分光光度计分别测得在 479nm 的吸光度。

(10) 记录测得的每个吸光度。

(11) 用改良的 DMEM(含酚红)液去洗腔面和胞浆部分，然后再把细胞放回培养箱。

(12) 接下来的几天均采用以上的方法处理细胞。

(13) 例如，对于 A6 细胞，在前 4 天，第(4)~(11)步每天进行。

(14) 在第 5 天和第 6 天，腔面在不含酚红的液体中的孵育时间应该提高到 1h。

(15) 到第 6 天，用不含酚红的组织培养液代替腔面液体，而浆面应该保持在含有酚红的 DMEM 改良液中[见注意事项(1)]。

333

(16) 6d 以后，在正常培养的条件下移去腔面液体和浆面液体来测其吸光度。

(17) 因此，6d 以后，饲养细胞的腔面液体中不含酚红。

(18) 在对 A6 细胞进行的实验中，培养时间通常是 2d 或 3d [见注意事项(2)]。

(19) 为了定量酚红流量和酚红通透性，腔面部分的吸光度不应该超过浆侧的 3%~10%。

3.2 酚红的流量和通透性

通过上述步骤，酚红的流量可以由分光光度计测得的吸光度推算出来。吸光度与流量的关系可用下面的方程表示：

$$J_{pr}= (A_{479}{}^{1}\times \mathrm{Vol}_1)/(t\times A\times EC\times Pl) \qquad [方程 26.1]$$

式中，J_{pr} 表示酚红流量(mol/cm^2/h)；$A_{479}{}^{1}$ 是在 479nm 时腔面液体的吸光度；Vol_1 表示腔面液体的体积(L)；t 表示以小时为单位的时间(h)；A 表示表皮的面积(即组织培养所占的面积,cm^2)；EC 表示消光系数(8450L/mol/cm)；Pl 表示光经过比色杯的光程长(cm)。

单层上皮对酚红的通透性用下面的流量方程计算：

$$P_{pr}=J_{pr}/[PR]$$ [方程 26.2]

式中，P_{pr} 表示对酚红的通透性(cm/s)；J_{pr} 表示推算出来的酚红流量；$[PR]$表示胞浆部分酚红的浓度(培养 A6 细胞培养液的酚红浓度接近 40μmol/L)。在组织培养液中酚红的浓度取决于所用的组织培养液的类型。

3.2.1 单位

在计算酚红通透性时必须注意使用正确的单位。

(1) 通透性的单位：cm/s。

(2) 酚红浓度单位：$mol/cm^3(mol/mL)$。

(3) 酚红流量单位：$mol/(cm^2 \cdot s)$。

3.2.2 举例

举例如下：上皮细胞被种植在面积为 $4.2cm^2$ 的滤片上。培养 6d 时，腔面的液体被不含酚红的液体代替，培养 24h 后(即种植后 7d)，腔面液体的吸光度为 0.004U，体积为 0.0015L。酚红通透性就可通过下面的步骤推算出来：

334

从方程 26.1 $J_{pr}=(0.004\times0.0015L)/[24h\times4.2cm^2\times8450L/(mol\cdot cm)\times1cm]$

得出 $J_{pr}=7.04\times10^{-12}\ mol/(cm^2 \cdot h)$；

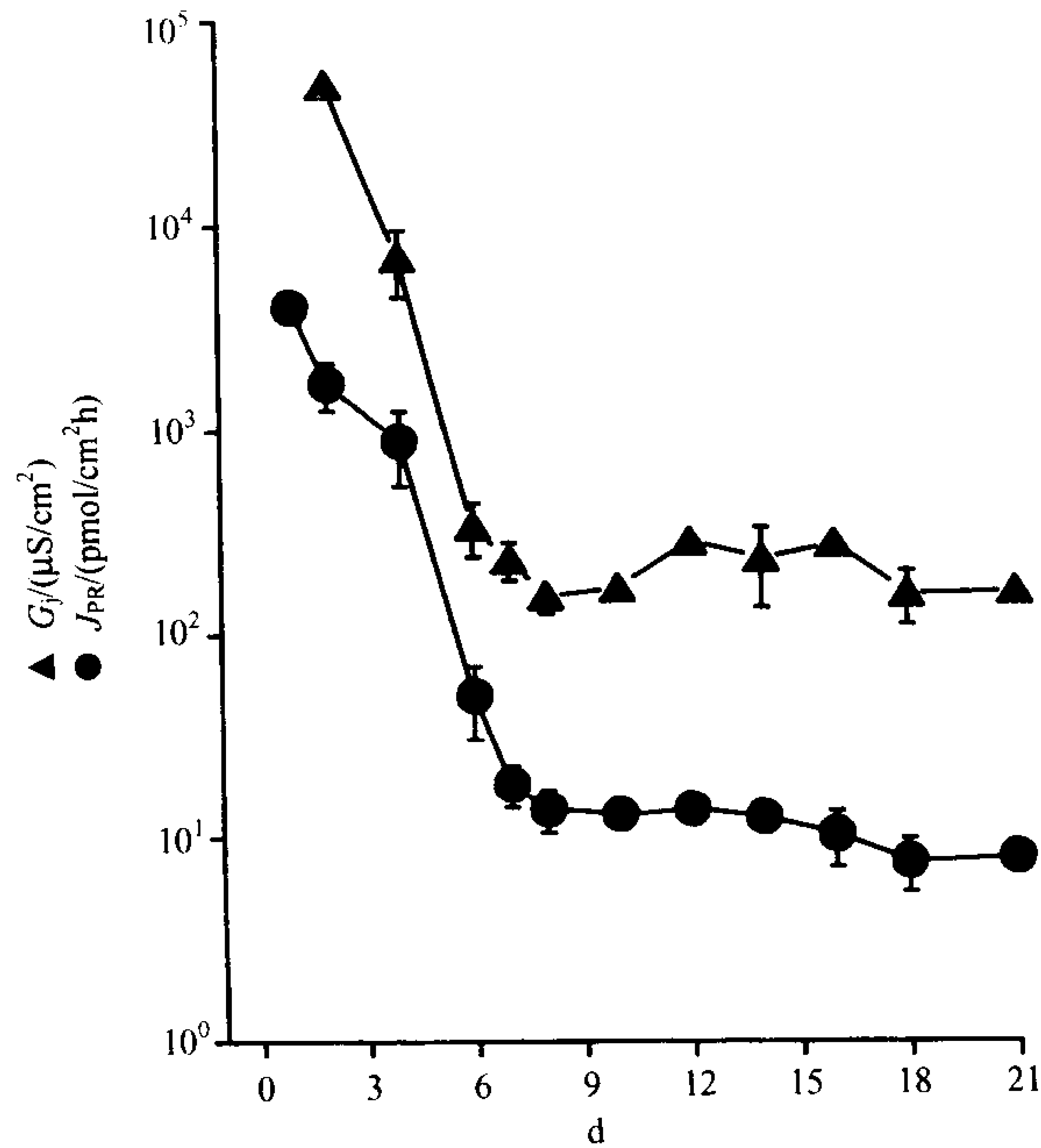


图 26.2 显示了随着细胞培养时间的延长，酚红流量减少

在这个例子中，也测得了跨上皮电导性(电阻的相反值)。每个点上的垂直线代表标准误。每个点分别是 4(在第 1~7 天)个值、3 个值(在第 8 天)、2 个值(在第 10~21 天)的平均值(经 Am. J.Physiol 允许，摘自 Jovov 等 1991 年的文章)

从方程 26.2　P_{pr}=1.96×10^{-15} mol/cm^2/s/40×10^{-9} mol/cm^3

得出 P_{pr} =49×10^{-9}cm/s。图 26.2 显示的酚红通透性下降是接种后时间的函数。这个例子来自于 A6 肾上皮细胞系。这个例子中，紧密连接的导电性与酚红流量是一致的。图 26.2 显示了导电性和酚红流量依时间减小，但在培养 8d 后保持稳定。这也表明酚红流量是上皮融合的一个有效标志，也是评定紧密连接导电性的一个理想指标。

335

3.2.3　由 P_{pr} 估计跨上皮电导

对很多人来说，酚红通透性的值是一个小且可能无意义的数字。为了让这个数字更有意义，我们从 P_{pr} 值来估测跨上皮电导。这种估计时间里在假设含酚红溶液的扩散系数与钠离子或氯离子扩散系数的比与不含酚红的溶液与它们的比相同的基础上。用 Delamere 和 Duncan 方程表示[3]：

$$G_t=(F^2/RT)\times P_{pr}\times \sqrt{w\times y}$$

$$w=([Cl]_l P_{Cl}/P_{pr}+[Na]_l P_{Na}/P_{pr}) \text{ 和 } y=([Cl]_p P_{Cl}/P_{pr}+[Na]_p P_{Na}/P_{pr})$$

式中，F 表示一个电感应常数(96 500 coulombs/mol)；R 表示气体常数(8.314J/℃/mol)，T 表示开氏温度(310°K)；P_{pr} 如前面所描述的；$[X]_i$ 表示腔面液体(l)或浆面液体(p)中的氯离子或钠离子的浓度(140×10^{-6}mol/cm^3)；P_X/P_{pr} 表示不含酚红的溶液中钠或氯离子的扩散系数与酚红的比例。这个比例可通过酚红的分子质量(354.4)与氯离子原子质量(35.5)或钠离子原子质量(22.9)的方根来推算。由此推算出来的电导系数是 176×10^{-6}S/cm^2，相当于 5680Ω·cm^2 的电阻。

3.2.4　净的溶液移动

为了准确地确定酚红在上皮细胞的流量或通透性，测量的时候我们需要知道腔面液体的体积。如果我们使用培养细胞时添加液体的体积，那么我们首先应假设没有净溶液穿过上皮细胞。测出组织培养液、腔面液、浆面液中酚红的吸光度并知道这 3 种液体的最初体积，就能推算在测量酚红流量时每一部分的体积。应用这个方法必须满足 2 个条件：第一，在整个过程中腔面液体与浆面液体的体积总和不变(即这部分液体的丢失等于另一部分液体的增加)；第二，这些细胞不能代谢或合成酚红(即酚红的量在整个过程中不变)。满足了这些条件就可应用下列方程：

$$A_{479}{}^{tcm}\times i\mathrm{Vol}_p=A_{479}{}^{l}\times(i\mathrm{Vol}_l-x)+A_{479}{}^{p}\times(i\mathrm{Vol}_p+x)$$

336

式中，上标 tcm、l、p 分别表示组织培养液、腔面液体、胞浆液；$A_{479}{}^{tcm}$ 表示在不同溶液中酚红的吸光度；iVol 表示的是所指部分的最初体积(mL 或 L)；x 指的是溶液丢失的体积或从别的部分增加来的体积，它的单位与 iVol 的相同；净溶液的体积通过求解前面提到的关于 x 的方程得到。x 为正值时表明溶液从腔面部分向浆面部分移动。值得注意的是，这种方法的建立与酚红在这两部分间流动机制无关。但是，当酚红在上皮细胞中保持平衡态时，这种方法是不成立的。该方法的有效性已在 A6 细胞培养系统中得到验证[1]。

4 注意事项

(1) 为了提高测量的准确性，酚红所流过部分的体积要尽可能得小。

(2) 在对 A6 细胞测量时发现测量时间可优化。操作者在进行 3.1 中步骤(3)和(4)时，可根据经验确定最佳操作时间。最佳时间依细胞类型、种植密度、生长条件等不同而变化。

(戴博杰　范秀军 译　黄文耿　王　莉 校)

参 考 文 献

[1] Jovov. B., Wills, N. K., and Lewis, S. A. (1991) A spectroscopic method for assessing confluence of epithelial cell culture. *Am. J. Physiol.* **261**, C1196-C1203.

[2] Wills, N. K., (1996) Epithelial cell culture, p. 236-255. In *Epithelial transport: a guide to methods and experimental analysis.* (Wills, N. K., Reuss, L., and Lewis, S. A., eds.). Chapman and Hall, London.

[3] Delamere, N. A. and Duncan, G. (1977) A comparison of ion concentrations, potentials and conductances of amphibian, bovine and cephalod lenses. *J. Physiol.* **271**, 167-186.

337

第27章　肝脏上皮细胞和肝脏细胞的共培养

Rolf Gebhardt

1　引言

以纯单层培养物形式生长的大鼠和其他动物的原代肝脏细胞在几天之内就会发生表型的改变[1~3]。改变在依赖细胞色素P-450的生物转化能力方面显得尤为突出，也可能涉及其他代谢途径，最终发生从成体到胎儿同工酶及蛋白质的转化[4~6]。这些变化大多是由于培养液中营养和(或)激素的缺乏和细胞外基质不足引起的[7,8]。1983年，Guguen-Guillouzo及其同事们在尝试建立一个更接近肝脏的培养环境时，观察到大鼠肝脏细胞和大鼠肝脏上皮细胞的共培养能够刺激肝脏细胞白蛋白持续分泌，并保持了这种分泌的可逆性[9]。许多研究表明，共培养为延长肝脏细胞的寿命及维持已分化的表型提供了一种颇具前景的培养方法[10,11]。这不仅包括肝脏细胞完成复杂的异型生物质的转化反应[12~15]，也包括其他特性，如生成急性期蛋白质、转运以及增殖[16~18]。因此，共培养的肝脏细胞在许多代谢和调节方面与原位肝脏细胞是等同的，因此可应用于多种生物学和毒理学领域[19]。然而，应该指出的是，共培养体系中某些功能和酶可能有别于正常。例如，环氧化物水合酶的活性降低[12]。另一方面，肝脏细胞与一些但不是所有的上皮细胞系的共培养会导致自发诱导产生谷氨酰胺合成酶[20,21]，这反映出肝脏细胞和上皮细胞

338

之间存在一种特殊的信号交换机制[22]。这些信号和细胞间的相互作用为肝脏细胞在肝实质中的不均匀分布提供了线索[23]。

这样直接引出了一个重要的问题，即导致原代肝脏细胞表型显著稳定的原因是什么？首先，有人提出，共培养体系产生一种特殊的细胞外基质[22]，但其成分尚未完全清楚。其次，有人对共培养的细胞之间是通过缝隙连接直接相连的结论提出异议[24]，认为这些细胞之间能够交换膜结合和膜溶解的信号和因子[25~27]。既然人们对这些因子尚未不清楚，那么肝脏细胞的共培养体系就可能为阐明并确定器官(如肝脏)内细胞-细胞之间的信号转导提供了一个很好的模型[22]。

2　材料

2.1　大鼠肝脏细胞的分离

(1) 戊巴比妥钠(75mg溶于2.5mL生理盐水中)，新鲜配制。

(2) 灌流液[见注意事项(1)]。

a. 溶液A：145mmol/L NaCl，5.4mmol/L KCl，0.77mmol/L $MgSO_4$，0.93mmol/L

$MgCl_2$，0.44mmol/L KH_2PO_4，0.34mmol/L Na_2HPO_4，10mmol/L HEPES，调 pH 至 7.4。

b. 溶液 B：145mmol/L NaCl，5.4mmol/L KCl，0.77mmol/L $MgSO_4$，0.93mmol/L $MgCl_2$，0.44mmol/L KH_2PO_4，0.34mmol/L Na_2HPO_4，10mmol/L HEPES，0.2%葡萄糖，0.2% 牛血清白蛋白(脱脂)，调 pH 至 7.4。

c. 溶液 C：137mmol/L NaCl，5.4mmol/L KCl，1.2mmol/L $MgSO_4$，0.15mmol/L KH_2PO_4，0.79mmol/L Na_2HPO_4，1mmol/L $CaCl_2$，10mmol/L HEPES，0.1%葡萄糖，调 pH 至 7.4。

(3) 胶原酶(由 z-甘氨酰-*L*-丙基-甘氨酰-*L*-丙基-*L*-丙氨酸组成的结构)。如果保持干燥，在−20℃可保存 1 年[见注意事项(2)]。

(4) 500mmol/L $CaCl_2$ 用蒸馏水溶解，通过 0.22μm 的滤器除菌，稀释度为 1：100。

(5) 0.5%台盼蓝(生理盐水稀释)。4℃保存可保存 3 周。若有沉淀可过滤使之澄清。

2.2 共培养的准备

(1) Williams 培养液 E：不含有谷氨酰胺，4℃保存数月。

(2) 培养液：Williams 培养液 E 添加 10%新生牛血清，2mmol/L *L*-谷氨酰胺，50U/mL 青霉素，50μmg/mL 链霉素。

(3) Hank 液 A(含有 HEPES)：8g/L NaCl，0.4g/L KCl，0.1g/L $MgSO_4(7H_2O)$，0.1g/L $MgCl_2(6H_2O)$，0.06g/L $Na_2HPO_4(2H_2O)$，0.06g/L KH_2PO_4，0.01g/L $CaCl_2$，0.48g/L HEPES，溶解于双蒸水中，调 pH 至 7.4，0.22μm 的滤器除菌，4℃保存 6 个月。

339

(4) Hank 液 B(不含 Ca^{2+}、Mg^{2+}及 HEPES)：由 Hank 液 A 中去掉 $CaCl_2$、$MgSO_4$、$MgCl_2$ 和 HEPES。

(5) Accutase：3mL/75cm^2 的小瓶(PAA 实验室)。

2.3 共培养糖原的染色

共培养糖原的染色[见注意事项(3)]。

(1) 甲醇。

(2) 0.5%的高碘酸。

(3) Schiff 试剂(检测乙醛)(Fluka)。

(4) 叠氮钠。

(5) 尼龙网：孔径为 250μm 和 100μm。

(6) 仪器：专为分离肝脏细胞而配置，带有 CO_2 培养箱、离心机、振荡水浴器、倒置光学显微镜、灭菌手术刀、血细胞计数器、灭菌移液管、一次性塑料培养瓶及培养皿。

3 方法

3.1 大鼠肝脏细胞的分离

3.1.1 肝脏的手术及灌流

(1) 腹腔内注射戊巴比妥钠(每千克体重 60mg)麻醉大鼠[见注意事项(4)]。

(2) 腹部剪毛、消毒，并将大鼠固定于手术台上。

(3) 打开腹腔，结扎下腔静脉及门静脉，将一个小插管准确地插入门静脉。

(4) 切断结扎的下腔静脉，用不含 Ca^{2+}的灌流液 A 冲洗肝脏以除去其中的血液，速度为 35mL/min[见注意事项(5)]。

(5) 继续灌流，直至用完 900mL 的溶液 A。

(6) 在进行灌注时，打开胸腔，在腔静脉的上端安置第 2 个插管。

(7) 结扎腔静脉的下端，使灌流液从腔静脉上端通过插管流出。

(8) 在溶液 A 将用尽时，小心地将肝脏从鼠体内移走，但肝脏仍连接灌流管。

(9) 将肝脏移至另一单独的容器内，使再循环灌流液处于恒温(37℃)及恒定水压(30cm 水柱)[见注意事项(6)]。

340

3.1.2 肝脏的胶原酶再循环灌流

(1) 将溶液 A 换成含有胶原酶的溶液 B(80mL 内含 70U)进行再循环灌流。灌流保持 35mL/min 的速度。

(2) 2min 后，向溶液 B 中加入 $CaCl_2$，使其终浓度为 5mmol/L。

(3) 继续用胶原酶灌流 15~20min 直至肝组织软化[见注意事项(7)]。

(4) 停止灌流，将肝脏移至含有 50mL 溶液 C 的烧杯中。

(5) 用剪刀在肝的被膜上穿几个小孔，不要切断肝叶。

(6) 用镊子夹住肝静脉的残端，在溶液 C 中轻轻摇晃以释放肝脏细胞[见注意事项(8)]。

3.1.3 肝脏细胞的纯化

(1) 用双层纱网过滤细胞悬液，去除成块组织及大的细胞团。

(2) 依次用 250μm 和 100μm 孔径的尼龙网对上述液体进行过滤。

(3) 过滤后，对细胞悬浮液 50*g* 离心 5min，弃去含有原代细胞碎片及非实质细胞的上清液[见注意事项(9)]。

(4) 重新小心地悬浮沉淀，50*g* 离心 3min，弃去上清。

(5) 重复步骤(4) 3 次。

(6) 最后，在溶液 C 中重新悬浮沉淀中的细胞。

3.1.4 细胞活力及数目的检测

(1) 将 100μL 台盼蓝与 250μL 细胞悬浮液混合[见注意事项(10)]。

(2) 在光学显微镜下用血细胞计数器计算活的细胞数(未染色)及死亡的细胞(呈蓝色)[见注意事项(11)]。

(3) 计算活细胞和死细胞的平均数及存活指数[见注意事项(12)]。

(4) 只使用存活指数超过 85%的细胞悬浮液。

3.2 共培养的准备

共培养的准备[见注意事项(13)]。

3.2.1 肝脏细胞的接种

(1) 用培养液稀释肝脏细胞悬浮液至浓度为 6.25×10^6 个/mL[见注意事项(14)]。

(2) 以 62.5×10^3 个/cm^2 的密度将细胞接种到塑料组织培养皿上[见注意事项(15)和(16)]。

(3) 将培养皿置于 37℃的 CO_2 培养箱中培养 2h，让肝脏细胞附着于其上。

(4) 移走培养液和未附着的细胞。

341

(5) 添加新的培养液或加入上皮细胞继续进行实验(见 3.2.2)。

3.2.2 肝脏上皮细胞的接种[见注意事项(17)]

(1) 取对数生长期的纯上皮细胞，去除培养液[见注意事项(18)]。

(2) 加入 1mL 的 Hank 液 B 在培养箱中培养 10min。

(3) 吸走 Hank 液 B。

(4) 加入 Accutase(1mL/25cm^2 的培养面积)[见注意事项(19)]。

(5) 置于室温 2~5min，直到细胞悬起(显微镜下识别)。

(6) 用吸管冲洗培养皿的底部所有的细胞。

(7) 转移细胞悬液到离心管中，150g 离心 3min。

(8) 弃去上清液，加入新的培养液。

(9) 将悬浮于新鲜培养液中的肝脏上皮细胞加到预先准备好的肝脏细胞培养体系中，轻晃培养瓶，确保上皮细胞均匀分布[见注意事项(20)]。

(10) 在 37℃、湿润的 CO_2 培养箱中培养细胞，每天更换培养液[见注意事项(21)]。

3.3 共培养的糖原染色

共培养的糖原染色[见注意事项(22)]。

(1) 从共培养体系中吸走培养液，用 Hank 液 A 冲洗培养的单层细胞 2 次。

(2) 加入冰冷的甲醇，固定 5min，弃去。

(3) 加入 0.5%的高碘酸，10min。

(4) 用蒸馏水冲洗。

(5) 加入 Schiff 试剂，在室温下放置 30min。

(6) 在流动的自来水下冲洗 30min，含有糖原的肝脏细胞会被染成紫红色[见注意事项(23)]。

(7) 加入 0.05%的叠氮钠保存。

4 注意事项

(1)本方案参照 Seglen[28]所述的第 2 步分离过程并做少许的修改，尽管使用碳酸氢盐培养液灌流已成功获得分离产物，但在我们实验中，采纳了由 Seglen 提出的同时使用 HEPES 缓冲培养液和 100%的氧气的方法，效果良好。

(2) 因为纯的胶原酶不易得到，所以在肝脏细胞的成功分离过程中，此酶的选择至

关重要。此酶会被其他(未知的)蛋白质水解作用所污染，建议将来自不同厂商不同批次的酶进行测试和比较，然后再大量订购，并储存于–20℃。

(3) 糖原染色使用的是 PAS 方法，此法已在病理学上应用广泛。因为只在肝脏细胞中发现糖原，所以，通过本染色方法可以在共培养中很容易鉴别出这种细胞，而且在继续培养之后肝脏细胞的生长状况也可由染色强度显示出来。

342

(4) 应该依据伦理标准及为动物饲养而制定的全国性专业规范来饲养和处理大鼠(成年和幼仔)。应该采用国际伦理准则，用戊巴比妥钠对大鼠进行麻醉。至关重要的是动物在被麻醉后应使用消毒剂进行处理，在摘除肝脏时应使用无菌器械。

(5) 为确保最低的氧化作用，灌流速度应控制在至少 35mL/min，灌流液应弃去。

(6) Mehendale[29]描述过一项既适合于再循环的肝脏灌流又适合于肝脏细胞分离的措施。肝脏应加以保护防止其表面干燥，而且防止在低于或高于 37℃的温度下进行灌流。

(7) 胶原酶灌注终止的最佳时间，可以用匙柄触及肝脏被膜来确定，若灌流完全，则会在触及点形成细小的沟，避免灌流肝脏时间过长。

(8) 作为可选的步骤，可以轻轻梳理肝脏来释放肝脏细胞。

(9) 据文献中记载的技术，上清液可用来进行非实质细胞的分离。这些细胞，如内皮细胞，也适于同肝脏细胞进行共培养。

(10) 用台盼蓝进行细胞染色是一项简单的活力检测，但需指出的是，用此种方法显示出的良好细胞活力与细胞培养的结果并不保持一致。

(11) 建议将混匀的台盼蓝溶液和细胞悬浮液静置 3min，以使没有活力的肝脏细胞核染色完全。

(12) 存活指数(%)=(活细胞数目×100)/(死细胞数目+活细胞数目)。

(13) 一般来说，共培养可以在肝脏细胞接种在平皿的同时或此后的任何时间建立。共培养越早，肝脏细胞的寿命越长，效果也就越好。然而，有时将肝脏细胞的悬浮液和肝脏上皮细胞混合后同时接种平皿可能会导致肝脏细胞的黏附不理想。人们发现在接种上皮细胞 2h 后进行肝脏细胞铺培养皿可获得传代的最佳效果。

(14) 在共培养中，肝脏细胞的密度可能变化很大，因此，可根据每次实验的具体要求进行选择。单层培养模式要求的最佳细胞密度是肝脏细胞单层培养的 1/2(62.5×10^3 个/cm^2)至 1/5(12.5×10^3 个/cm^2)之间。

(15) 建议使用预先铺有胶原蛋白的培养皿及培养瓶(I 型或 IV 型更佳)[见注意事项(9)和(15)]。

(16) 轻轻摇动培养皿，确保肝脏细胞均匀分布。

343

(17) 按本书第 6 章介绍的方法可以获得大鼠肝脏上皮细胞。若细胞从冻融状态下解冻，那么在用它们进行共培养之前须传代一次。

(18) 注意上皮细胞传代用的培养液与前述肝脏细胞及共培养用的培养液不同(见第 6 章)。

(19) Accutase 在上皮细胞的分离过程仅产生较小的损伤。另外，也可选择 0.1%的胰蛋白酶。

(20) 准备共培养的上皮细胞悬浮液浓度一定要达到足以充满肝脏细胞之间的自由空隙，也就是说上皮细胞的接种浓度要稍高些。所以，当肝脏细胞在半满(62.5×10^3 个/ cm^2)

培养时，上皮细胞的浓度应达到 10^6 个/mL，也就是终浓度为 10^5 个/ cm^2。

(21) 共培养的肝脏细胞可存活数周。它们维持其多角形的形态且会重新形成一个似细长胆小管的吻合网状结构(图 27.1)。尽管肝脏细胞的表型在共培养期间相当稳定，仍需注意它们的许多功能会发生变化。

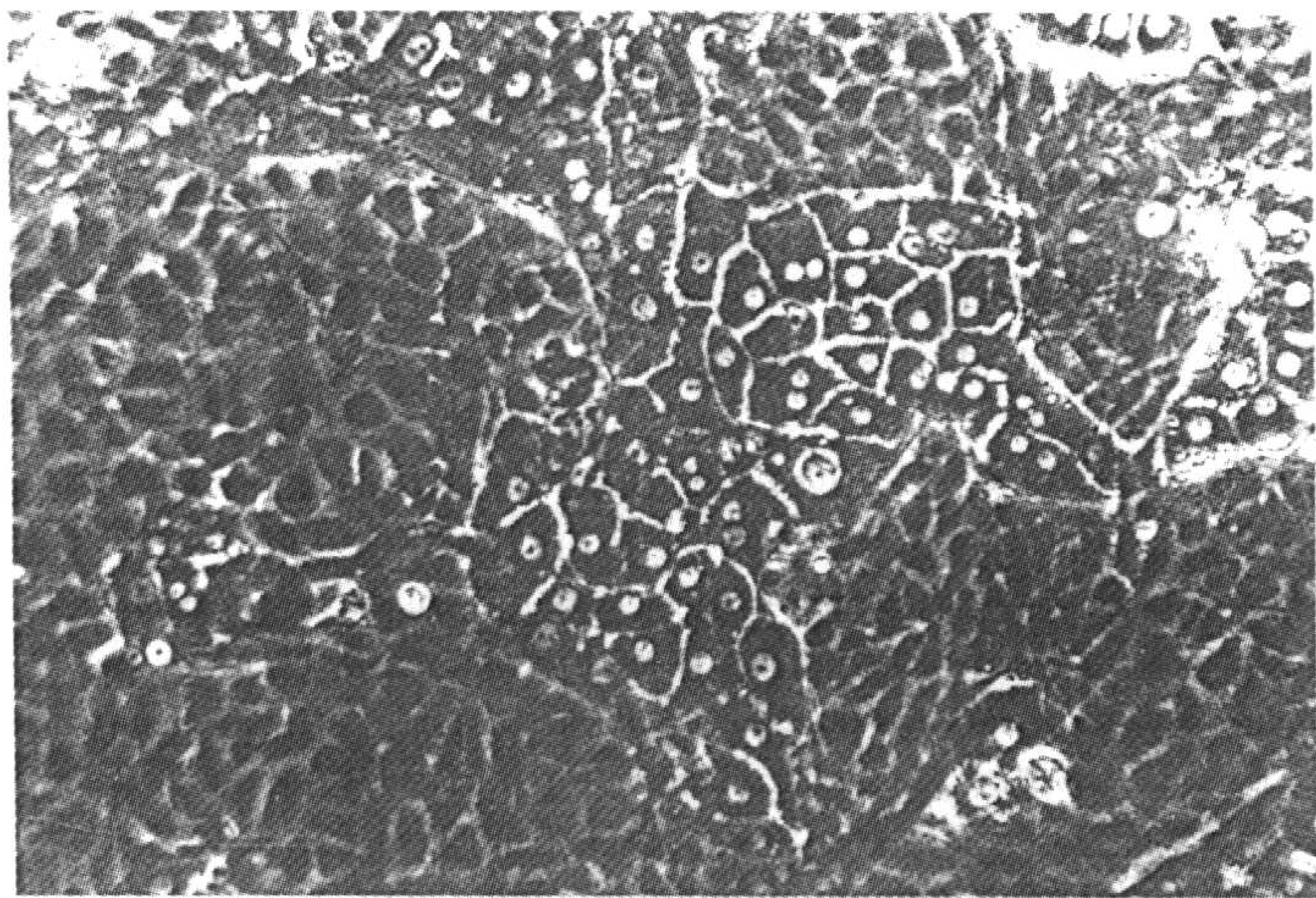


图 27.1　共培养 1 周后的原代大鼠肝脏细胞及肝脏上皮细胞(line RL-ET-14[6])

图示为多角形的肝脏细胞(有清晰的圆形细胞核)及其周围一个由细长而透明的管道组成的吻合网状结构，此结构对应于新形成的胆小管。相差显微镜；放大倍数 40×

344

(22) 在单独培养肝脏细胞时，常会出现强弱相间的肝脏细胞糖原染色细胞，而在共培养的肝脏细胞中会得到更均一的染色效果。若需要较高水平的糖原进而得到较强的染色结果，可以在染色前 24h 向培养液中添加 20mmol/L 的葡萄糖及 0.1μmol/L 的胰岛素。共培养的肝脏细胞可以得到均一、明显的糖原染色结果(图 27.2)。这种染色技术可用于计算机图像分析，计算肝脏细胞的数目。

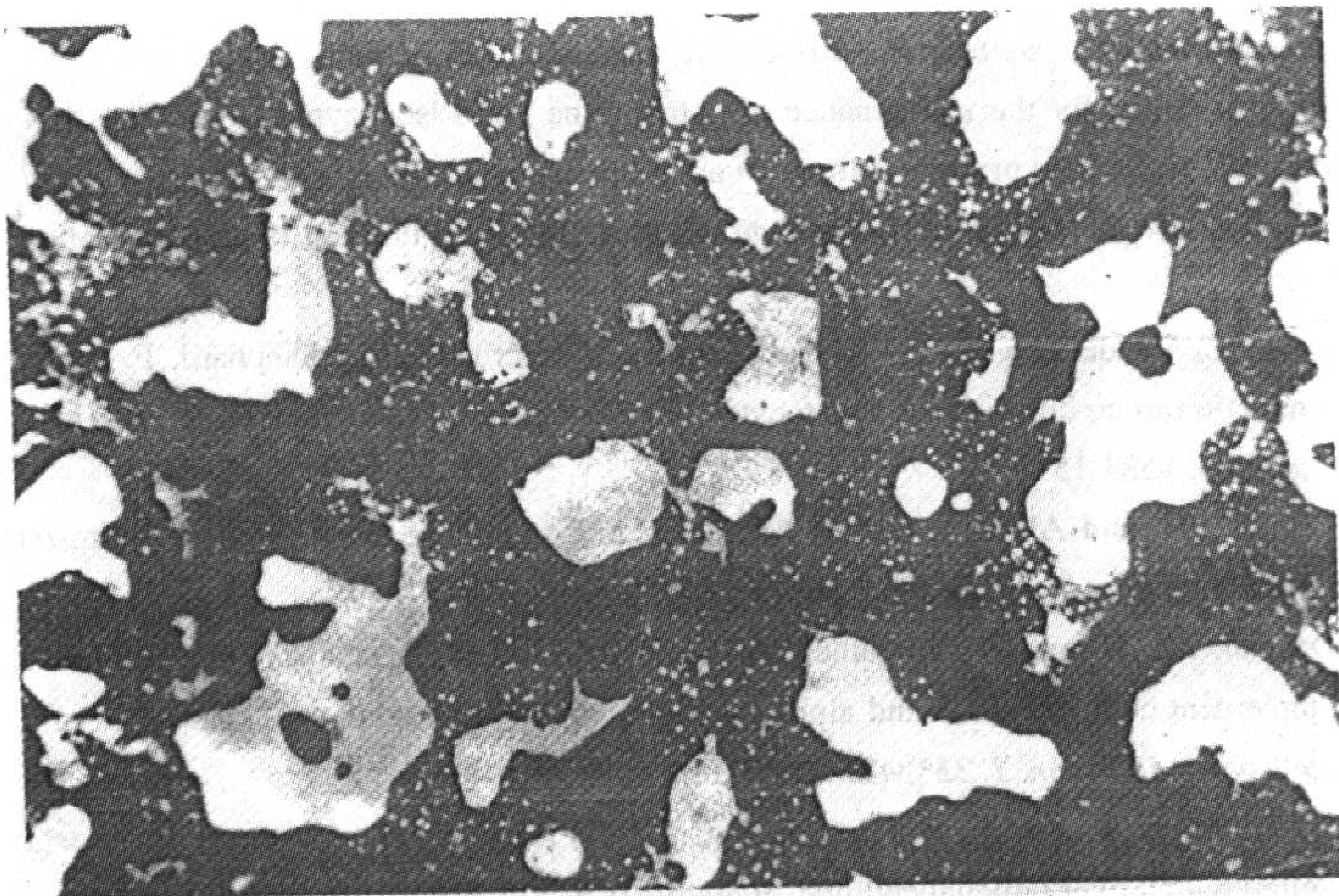


图 27.2　PAS 法糖原染色且保存 1 周的共培养原代大鼠肝脏细胞和肝脏上皮细胞

在固定前 24h 该培养液中已添加 20mmol/L 葡萄糖及 0.1μmol/L 胰岛素。图示为肝脏细胞胞质中的大量糖原(无核)，而上皮细胞中没有糖原染色。放大倍数 25×

(23) 避免培养皿直接与水流接触，否则会冲掉部分细胞层。用一个盛满水的容器，使水流从一侧流入，将培养皿放在对侧。

(李素敏 贾莉玮 译 戴博杰 王 莉 校)

参 考 文 献

[1] Gebhardt, R., Bellemann, P., and Mecke, D. (1978) Metabolic and enzymatic characteristics of adult rat liver parenchymal cells in non-proliferating primary monolayer cultures. *Exp. Cell Res.* **112**, 431-441.

[2] Guguen-Guillouzo, C. and Guillouzo, A. (1983) Modulation of functional activities in cultured rat hepatocytes. *Mol. Cell. Biochem.* **53/54**, 35-36.

345 [3] Guillouzo, A. and Guguen-Guillouzo, C. (eds.) (1986) *Isolated and cultured hepatqcytes.* John Libbey Eurotext Ltd/INSERM, London.

[4] Paine, A. J. (1990) The maintenance of cytochrome P450 in rat hepatocyte culture: some applications of liver cell cultures to the study of drug metabolism, toxicity and the induction of the P-450 system. *Chem. Bioi. Interact.* **74**, 1-31.

[5] Isom, H. C., Secott, T., Georgoff, I., Woodworth, C., and Mummaw, J. (1985) Maintenance of differentiated rat hepatocytes inprimary culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 3252-3256.

[6] Gebhardt, R. (guest ed.) (1997) International Congress on Hepatocytes. *Cell Biol. Toxicol.* **13**, 215-386.

[7] Gebhardt, R. and Mecke, D. (1979) The role of growth hormone, dexamethasone and trijodothyronine in the regulation of glutamine synthetase in primary cultures of rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* **100**, 519-525.

[8] Schuetz, E. G., Li, D., Omieciniski, C. J., Muller-Eberhard, U., Kleinman, H. K., Elswick, B., and Guzelian, P. S. (1988) Regulation of gene expression in adult rat hepatocytes cultured on a basement membrane matrix. *J. Cell. Physiol.* **134**, 309-323.

[9] Guguen-Guillouzo, C., Clement, B., Baffet, G., Beaumont, C., Morel-Chany, E., Glaise, D., and Guillouzo,A. (1983) Maintenance and reversibility of active albumin secretion by adult rat hepatocytes co-cultured with another liver epithelial cell type. *Exp. Cell Res.* **143**, 47-54.

[10] Begué, J.-M., Guguen-Guillouzo, C., Pasdeloup, N., and Guillouzo, A. (1984) Prolonged maintenance of active cytochrome P-450 in adult rat hepatocytes co-cultured with another liver cell type. *Hepatology* **4**, 839-842.

[11] Lescoat, G., Pasdeloup, N., Kneip,B., and Guguen-Guillouzo, C. (1987) Modulation of alpha-fetoprotein, albumin and transferrin gene expression by cellular interactions and dexamethasone in co-cultures of fetal rat hepatocytes. *Eur. J. Cell Biol.* **44**, 128-134.

[12] Ratanasavanh, D., Beaune, P., Baffet, G., Rissel, M., Kremers, P., Guengerich, F. P., and Guillouzo, A. (1986) Immunocytochemical evidence for the maintenance of cytochrome P450 isoenzymes, NADPH cytochrome C reductase and epoxide hydratase in pure nad mixed primary cultures of adult human hepatocytes. *Food Chem. Toxicol.* **24**, 577-578.

[13] Rogiers, V. and Vercruysse, A. (1993) Rat hepatocyte cultures and co-cultures in biotransformation studies of xenobiotics. *Toxicology* **82**, 193-208.

[14] Akrawi, M., Rogiers, V., Vandenberghe, Y., Palmer, C. N. A., Vercruysse, A., Shephard, E. A. and Phillips, I. R. (1993) Maintenance and induction in co-cultured rat hepatocytes of components of the cytochrome P-450 mediated monooxygenase. *Biochem. Pharamacol.* **45**, 1583-1591.

[15] Gebhardt, R., W egner , H. and Alber, J. (1996) Perifusion of co-cultured hepato- cytes: optimization of studies on drug metabolism and cytotoxicity *in vitro. Cell Bioi. Toxicol.* **12**, 57-68.

346 [16] Lebreton, J.-P., Daveau, M., Hiron, M., Fontaine, M., Biou, D., Gilbert, D. and Guguen-Guillouzo, C. (1986) Long-term biosynthesis of complement component C3 and alpha-l acid glycoprotein by adult rat hepatocytes in a co-culture system with an epithelial liver cell-types. *Biochem. J.* **235**, 421-428.

[17] Foliot, A., Glaise, D., Erlinger, S. and Guguen-Guillouzo, C. (1985) Long-term maintenance of taurocholate uptake by adult rat hepatocytes co-cultured with a liver pithelial cell line. *Hepatology* **5**, 215-219.

[18] Karam, W. G. and Ghanayem, B. I. (1997) Induction of replicative DNA synthesis and PPAR alpha-dependent gene transcription by Wy-14 643 in primary hepatocytes and non-parenchymal cell co-cultures. *Carcinogenesis* **18**, 2077-2083.

[19] Gebhardt, R.. and Hartung, T. (1996) Cokulturen in der *in vitro*-toxikologie. *Biospektrum* **2**, 36-39.

[20] Schrode, W., Mecke, D. and Gebhardt, R. (1990) Induction of glutamine synthetase in periportal hepatocytes by cocultivation

with a liver epithelial cell line. *Eur. J. Cell. Biol.* **53**, 35-41.

[21] Gebhardt, R., Schrode, W ., and Eisenmann- Tappe, I. (1998) Cellular characteristics of epithelial cell lines from juvenile rat liver: selective induction of glutamine synthetase by dexamethasone. *Cell Biol. Toxicol.* **14**, 55-67.

[22] Gebhardt, R. and Gaunitz, F. (1997) Cell-cell interactions in the regulation of the expression of hepatic enzymes. *Cell Biol. Toxicol.* **13**, 263-273.

[23] Gebhardt, R. (1992) Cell-cell-interactions: clues to hepatocyte heterogeneity and beyond? *Hepatology* **16**, 843-845.

[24] Mesnil, M., Fraslin, J. M., Piccoli, C., Yamasaki, H., and Guguen-Guillouzo, C. (1987) Cell contact but not junctional communication (dye coupling) with biliary epithelial cells is required for hepatocytes to maintain differentiafedfunctions. *Exp. Cell Res.* **173**, 524-533.

[25] Corlu, A., Kneip, B., Lhadi, C., et al. (1991) A plasma membrane protein is involved in cell contact -mediated regulation of tissue-specific genes in adult hepa-tocytes. *J. Cell Biol.* **115**, 505-515.

[26] Haupt, W., Schrode, W., and Gebhardt, R. (1998) Conditioned medium from cultured rat hepatocytes completely blocks induction of GS by dexamethasone in several liver epithelial cell lines. *Cell Biol. Toxicol.* **14**, 69-80.

[27] Gebhardt, R., Schuler, M., and Schörner, D. (1998) The spontaneous induction of glutamine synthetase in pig hepatocytes co-cultured with RL-ET-14 cells is completely inhibited by trijodothyronine and okadaic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **246**, 895-898.

[28] Seglen, P. O. (1976) Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol.* **13**, 29-83.

[29] Mehendale, H. M. (1982) Application of isolated organ techniques in toxicology, p. 509-559. In *Principles and methods of toxicology* (Hayes, A. W., ed.). Raven Press, New York.

347

第 28 章 内皮细胞与血管平滑肌细胞的共培养及由细胞内钙介导的胞间对话

Wee Soo Shin, Chieko Hemmi，Teruhiko Toyo-oka

1 引言

本章的目的是描述建立血管平滑肌细胞(VSMC)[1]和血管内皮细胞[2]原代培养的基本步骤。通过对平滑肌细胞和内皮细胞(EC)间的二维 Ca^{2+}图像分析直接显示这两类细胞间存在对话[3]。细胞内 Ca^{2+}的图像分析需将这两种细胞共培养，此方法被描述过。Tsien 小组研制出钙敏感的荧光染料，使细胞内的钙动力学及细胞功能领域的研究取得了显著进展。在胞内钙浓度的测定中，这些染料适用于历时较长的重复性实验，即便没有对钙敏感的光蛋白(发光蛋白质)或金属铬染料做前处理，这种方法也能得到更高的信噪比[4]。这些进展包括肌细胞的兴奋、收缩耦联、内分泌细胞的兴奋、分泌耦联和细胞内及细胞间信号转导机制的研究[5]。近年来，在 NO，一个多功能效应器分子的行为学研究领域也取得了进步，它不仅可传递血管松弛、神经转导和细胞毒素的信号，而且在粥样硬化、细胞程序化死亡及细胞氧化还原中都充当了关键的角色[6~8]。所有这些成果在很大程度上得益于首次由 Fay 及其合作者阐述的图像分析系统[9]。因此，本章也将阐述胞内 Ca^{2+}图像分析的基本原理。我们使用“等同培养”指代一种类型的细胞在分离情况下可以生长，用“共培养”描述同一培养皿中两种细胞可以共存。

348

2 材料

2.1 VSMC 的分离

(1) Wistar 大鼠，5~6 周龄[见注意事项(1)]。
(2) 测定 Ca^{2+}的玻璃培养皿。
(3) 齿状蜡板(GC 公司)。
(4) 21 号的针。
(5) 10mL 一次性注射器。
(6) 一次性解剖刀。
(7) 塑料组织培养皿。
(8) 高压灭菌的一次性巴氏移液管。
(9) 10mL 无菌塑料吸管。
(10) 50mL 无菌锥形管。
(11) 滤纸(孔径 100μm)及过滤支架。

(12) 解剖器械盒(2 种大小不同的剪刀和镊子)。

(13) 酒精棉球(70%乙醇)。

(14) 溶液 A：DMEM(Life Technologies)。

(15) 溶液 B：DMEM 加上 10%热灭活的胎牛血清(Cell Culture Technologies)，1%抗生素——抗真菌混合物(Life Technologies)。4℃保存，使用前预热至 37℃。

(16) 酶溶液 1(20mL)：在 20mL 溶液 A 中溶解 30mg I 型胶原酶(Worthington)(终浓度为 1.5mg/mL)，7.5mg 1-S 型大豆胰蛋白酶抑制剂(Sigma)(终浓度为 0.375mg/mL)，混匀，通过 0.22μm 微孔的细菌过滤器(Millipore)除菌，分装在 2 个灭菌的锥形管中(每管 10mL)，4℃保存。

(17) 镜头纸。

2.2 牛腹主动脉 EC 的原代培养

(1) 一小段牛腹主动脉(长度为 10cm)[见注意事项(3)]。

(2) 23 号针头。

(3) 20mL 一次性注射器。

(4) 溶液 C：DMEM 加入 1%抗生素-抗真菌的混合物。

(5) 酶溶液 2(20mL)：在 20mL 溶液 A 中溶解 2000U 分散酶(Godo Shusei，Japan)(终浓度为 1000U/mL)，0.22μm 的细菌过滤器除菌。1000U/mL 的分散酶用于除去 EC 而不伤及下面的 VSMC。

(6) 磷酸盐缓冲液(PBS)，不含有 Ca^{2+}和 Mg^{2+}(Life Technologies)。

2.3 EC 和 VSMC 的共培养

胰蛋白酶-EDTA(0.05%胰蛋白酶，0.53mol/L EDTA)，液态(Life Technologies)。

2.4 用二维图像分析系统对 Ca^{2+}进行测定

349

对 Ca^{2+}测定过程如图 28.1 所示。

(1) 将 1mmol/L Fura-2 的乙酰甲基形式(Fura-2 AM)(Dojin Chemical，Japan)溶解在二甲基亚砜(DMSO)中(Wako Pure Chemical，Japan)，作为储备液。

(2) 含 1mmol/L $CaCl_2$ 的 PBS (−)。

(3) 进行二维 Ca^{2+}测量及图像分析的计算机硬件(图 28.1)[见注意事项(4)]。

a. 有紫外荧光物镜(甘油浸渍自由荧光，×20、×40 或×100)的倒置荧光显微镜(Diaphot，Nikon)。

b. 氙灯(75W，Nikon)。

c. 计算机辅助控制器自动转换的干涉滤器(340 nm 或 380nm，10nm 带宽)。

d. 弱化滤器及绝热滤器(Nikon)。

e. 硅靶照相机(SIT)(C2400，Hamamatsu Photonics，Japan)。

f. 在线图像信息处理机(DVS-3000，Hamamatsu Photonics，Japan)。

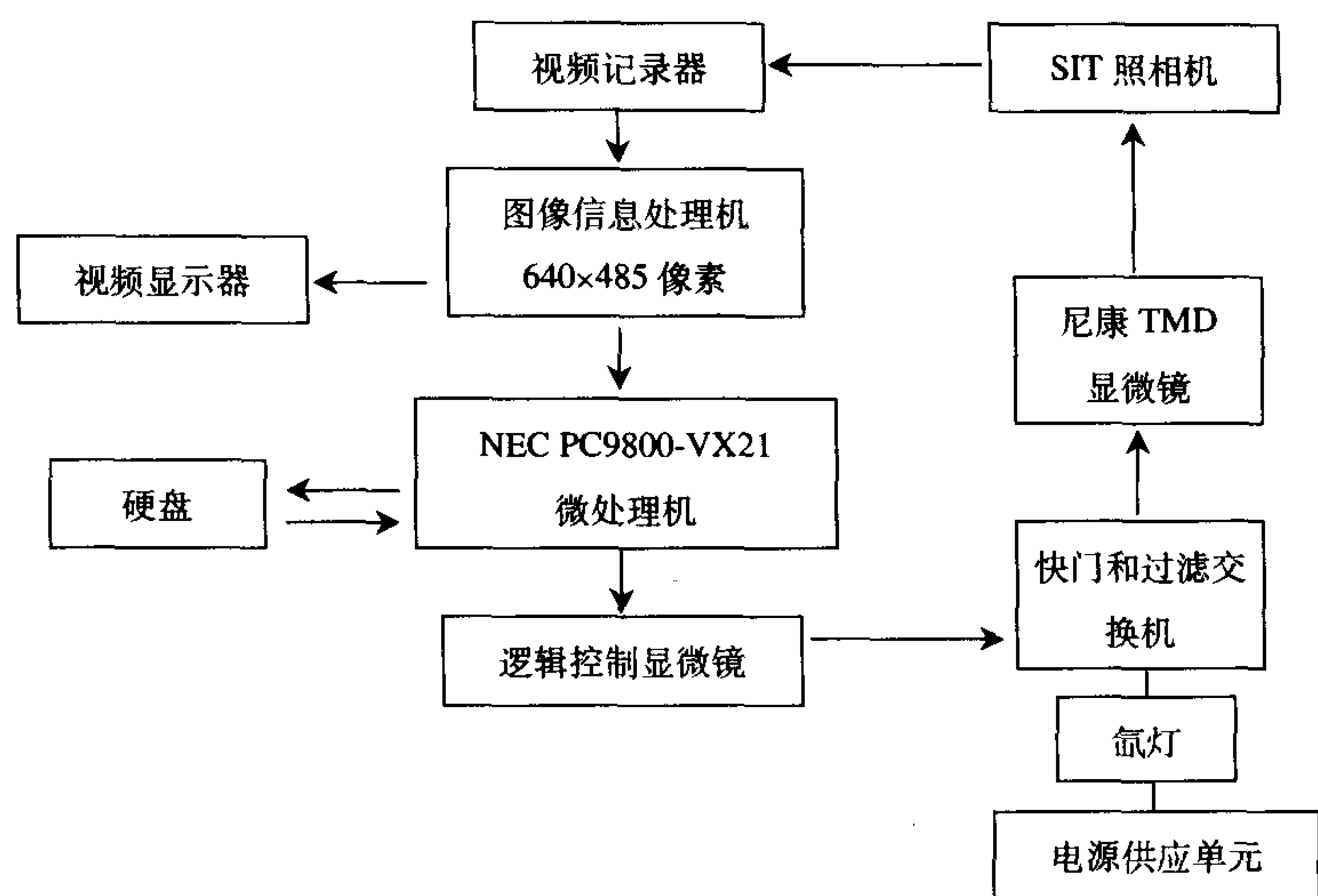


图 28.1 二维钙图像分析系统

在紫外光(340 nm 或 380nm)的照射下细胞在游离的荧光玻璃上被激发，而且 $Ca^{2+}{}_i$ 表达成 fura-2 荧光的图像可以通过 SIT 照相机检测并被保存在视频带上。通过二维图像分析信息处理器可将再生的 $Ca^{2+}{}_i$ 图像进行数字化处理[见注意事项(4)和(11)~(13)]

350

2.5 试剂应用的方案举例

(1) 三磷酸腺苷(ATP)(Sigma)。

(2) 高钾溶液(100mL,80mmol/L)：将 884mg KCl(18.53mmol/L),20mg KH_2PO_4(1.47mmol/L), 124mg NaCl(21.15mmol/L)，100mg Na_2HPO_4(8.37mmol/L)，10mg $MgCl_2$(0.49mmol/L)，10mg $CaCl_2$(0.9mmol/L)加到 100mL 蒸馏水中，混匀，高压灭菌。对半稀释至 40mmol/L 的工作浓度。

(3) 血管紧张素 II(Ang II)(Sigma)。

(4) 含 Ca^{2+}及 Mg^{2+}的 PBS(+)(40mL)：分别将 400μL 100mmol/L 的 $CaCl_2$ 原液(1mmol/L $CaCl_2$)，20μL 1mol/L 的 $MgCl_2$(0.5mmol/L $MgCl_2$)原液加入到 40mL 的 PBS(−)(Life Technologies)中，充分混匀。

3 方法

3.1 VSMC 的分离

(1) 截取大鼠胸主动脉，置于盛有 10mL 溶液 C 的培养皿中。

(2) 用小镊子从动脉管上刮去血液，避免过度拉扯动脉。

(3) 将动脉置于盛有酶溶液 1 的管中，37℃强烈振荡培养 10min。

(4) 将动脉转至含有溶液 C 的第 2 个培养皿中。

(5) 用镊子从动脉上剥去外膜，外膜易剥离。

(6) 用剪刀纵向切开动脉，成长条状。

(7) 用高压灭菌过的棉球擦拭动脉内表面(内皮侧)，去除 EC。

(8) 用一次性解剖刀切碎动脉长条。

(9) 将动脉碎片放在盛有酶溶液 1 的离心管中，于 37℃、100r/min 持续轻摇 90min。

(10) 用 21 号针抽打动脉碎片，重复数次。

(11) 将镜头清洁纸在塑料管中双层折叠，过滤酶消化的动脉碎片。

(12) 将溶液倒入 50mL 清洁的锥形管中，并向管中加约 2~3 倍体积的溶液 B。

(13) 在室温下 300*g* 离心 10min。

(14) 用真空泵吸出上清液。

(15) 用 4mL 溶液 B 重新悬浮。

(16) 取出 1mL 分装的悬浮细胞放到一个预先高压灭菌的玻璃皿中。

(17) 在倒置显微镜下检查细胞，确信所有分散的细胞都保持长纺锤形，而且无明显的细胞碎片。

(18) 在 95%空气、5%CO_2、37℃的条件下培养。

(19) 每 2 天更换培养液[见注意事项(7)]。

(20) 图 28.2A 显示长满的原代培养的 VSMC。

351

3.2 牛腹主动脉 EC 的原代培养

(1) 从屠宰厂取一段新鲜的牛主动脉环，放在含 50mL 溶液 A 的管中。

(2) 回到实验室后，用连接真空泵的巴氏吸管移走溶液。

(3) 用 PBS 冲洗主动脉 2 次，移走 PBS。

(4) 加入 20mL 酶溶液 2。

(5) 在 37℃以中等速度(100r/min)摇动，孵育 60min。

(6) 将酶溶液(含分散细胞)吸到 20mL 注射器中，并使之通过 23 号的针孔[见注意事项(8)]。

(7) 用吸取的酶溶液冲洗动脉环内表面(内皮层)数次[见注意事项(9)]。

(8) 用灭菌的镊子移走动脉环。

(9) 向 50mL 酶溶液的管中加入约 1~2 倍体积的溶液 B。

(10) 以 300*g* 的转速在室温下离心。

(11) 用真空泵吸走上清液[见注意事项(6)]。

(12) 向管中加入 10mL 的溶液 B，再重新悬浮沉淀。

(13) 将含有细胞的溶液移至新的培养皿中。

(14) 在倒置显微镜下检查细胞，确认酶消化的细胞呈柠檬或橄榄球状，但并不呈圆形。

(15) 在 95%空气、5%CO_2、37℃的条件下培养。

(16) 每 2 天更换培养液[见注意事项(10)]。

(17) 图 28.3A 显示长满原代培养的 EC。

3.3 EC 和 VSMC 的共培养

(1) 以 1.5Å×10^3 个/cm^2 的密度将 VSMC (见 3.1)接种到培养皿上，用血细胞计数器来计算细胞数，连续培养 4d。

(2) EC(见 3.2)生长至融合。

(3) 用 PBS 冲洗 EC 2 次，吸走 PBS。

(4) 向培养液中加入 2mL 的胰蛋白酶溶液，在 95%空气、5%CO_2、37℃的条件下孵育 5min。

(5) 向培养皿中加入 5mL 溶液 B，灭活胰蛋白酶。

(6) 用移液管(吹吸)数次，打散细胞。

(7) 移至 50mL 离心管中。

(8) 另加入 20mL 的溶液 B。

(9) 以 300*g* 转速室温下离心 5min。

(10) 用真空泵吸取上清液[见注意事项(6)]。

(11) 向管中加入 10mL 溶液 B，重新悬浮沉淀。

(12) 以 $1.5Å\times10^3$ 个/cm^2 的密度向培养皿中接种 EC，培养皿中已有半满的原代 VSMC[见注意事项(12)]。

(13) VSMC 和 EC 在同一培养皿中培养。

(14) 每 2 天更换一次培养液(B)。

(15) 接种 VSMC 后第 7 天，可用共培养的 VSMC 和 EC 进行以下实验(图 28.4A)。

352

3.4 用二维图像分析系统对 Ca^{2+}进行测定

(1) 向细胞培养液中加入溶解于 DMSO 中的 fura-2 AM，终浓度为 4μmol/L。

(2) 95%空气、5%CO_2、37℃，在 fura-2 AM 中培养 EC 和(或)VSMC 40min。

(3) 用加入 1mmol/L $CaCl_2$ 的 PBS 冲洗细胞 2 次，去除残留的 fura-2 AM。

(4) 在室温下稳定 20min，然后进行荧光测定。

(5) 将含有 fura-2 AM 处理过的细胞玻璃培养皿放置于预热至 37℃的倒置荧光显微镜的载物台上。

(6) 使用 2s 间隔的控制器自动转换干涉滤器即可获得 340nm 或 380nm 激发光，位于滤器和灯光聚光镜片之间的光闸可控制曝光时间。

(7) 通过双色镜可过滤掉 fura-2 AM 散射光谱中 500nm 以上的光波，其余则聚焦于 SIT 照相机。

(8) 实验中将 VSMC 的 fura-2 AM 图像存储在视频记录仪上。

(9) 用在线的图像信息处理机将这些细胞的荧光图像在 640×485 像素及 8bit 范围内进行数字化处理[见注意事项(8)]。

353

(10) 在 340 或 380nm 处减弱背景，通过在像素底节上拆分像素及转变 Ca^{2+}的浓度来重组二维图像的比例(340/380nm)[见注意事项(14)及(15)]。

3.5 试剂应用的方案举例

试剂应用的方案举例(图 28.2~图 28.5)

(1) 在 37℃平衡细胞 10min 后，用 20μmol/L 的 ATP 刺激 EC 和(或)VSMC 并在 3min 内进行 Ca^{2+}图像的测量[见注意事项(16)]。

(2) 用 PBS(+)冲洗掉 ATP，室温下放置细胞 10min。

(3) 加入高钾溶液，允许带有电压依赖性 Ca^{2+}通道对 VSMC 进行识别以及在 VSMC 的肌浆网状组织中对 Ca^{2+}进行装载。

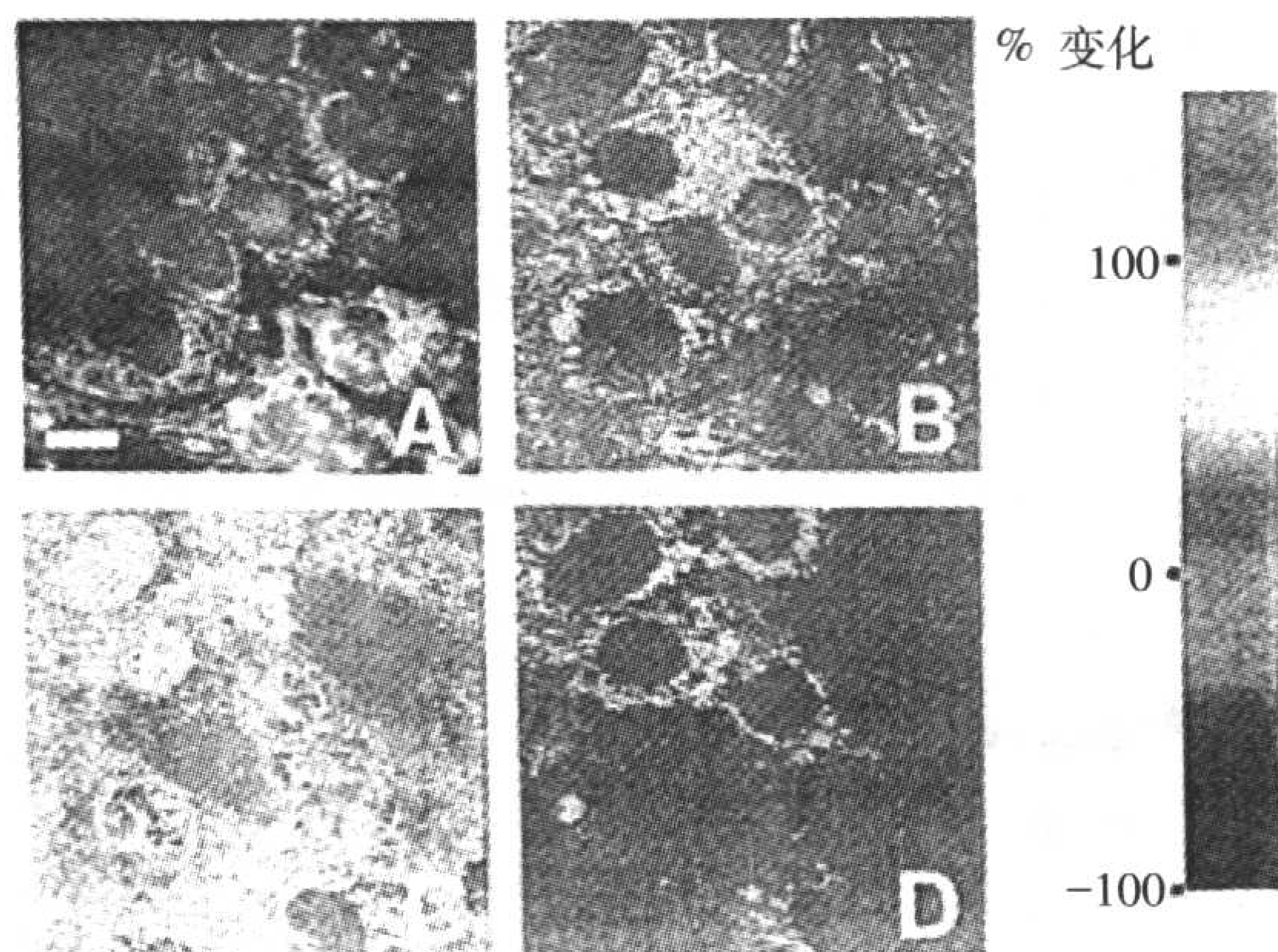


图 28.2　等同培养的大鼠主动脉血管平滑肌细胞中 Ca^{2+}_i 反应的二维图像(×1000) [3]

激发波长为 340nm 时，处于静息状态 fura-2 标记的细胞(A)，在用 1μmol/L ATP(B)、40mmol/L KC1(C)或 30nmol/L Ang(II)(D)处理后，峰值处 F340/F380 与静息 F340/F380 相比得到的图像。标尺长度为 20μm

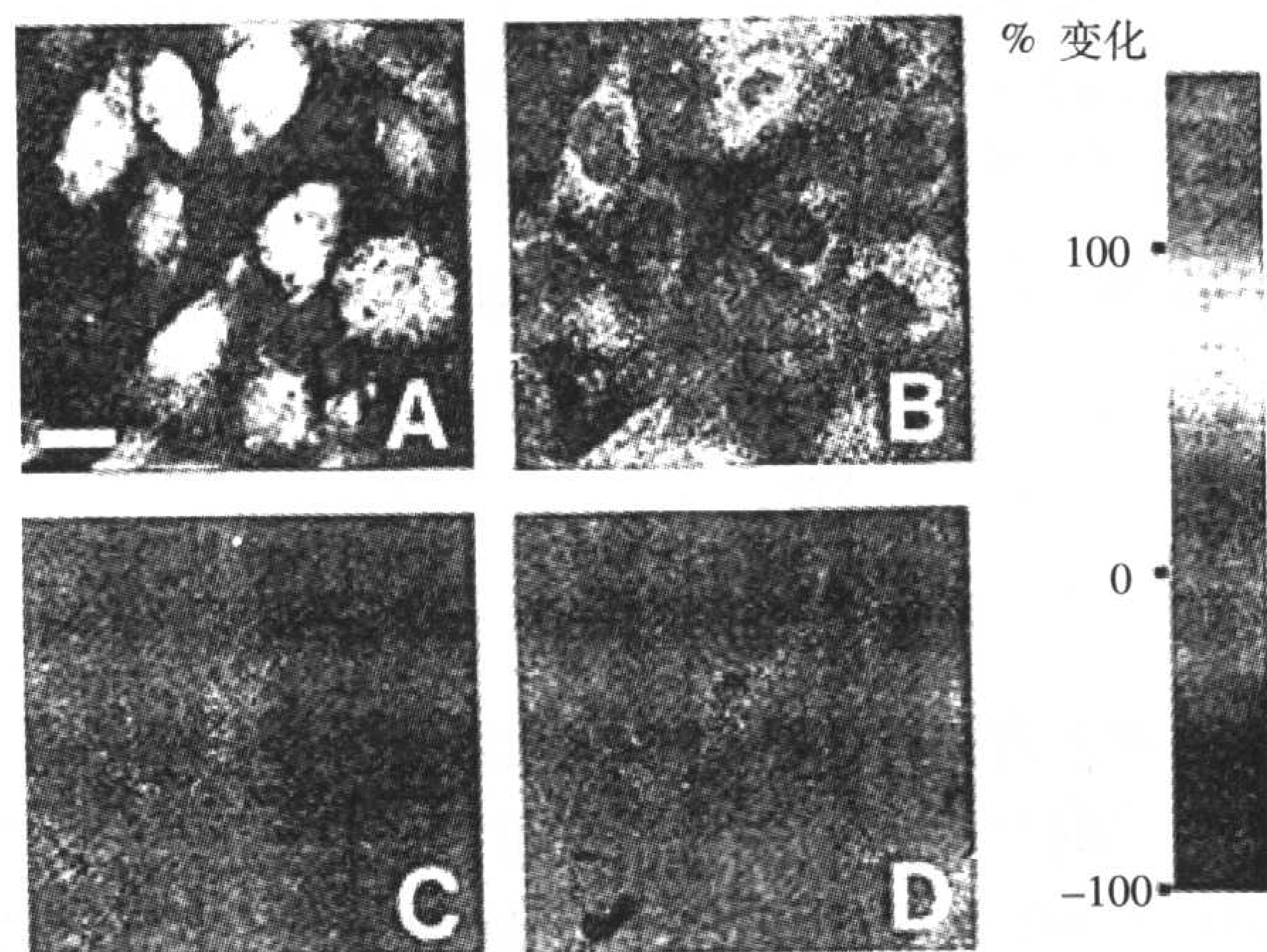


图 28.3　等同培养的牛主动脉内皮细胞中 Ca^{2+}_i 反应的二维图像(×1000) [3]

激发波长为 340nm 时，处于静息状态 fura-2 标记的细胞(A)，在用 1μmol/L ATP(B)、40mmol/L KC1(C)或 30nmol/L Ang(II)(D)处理后，峰值处 F340/F380 与静息 F340/F380 相比得到的图像。标尺长度为 20μm

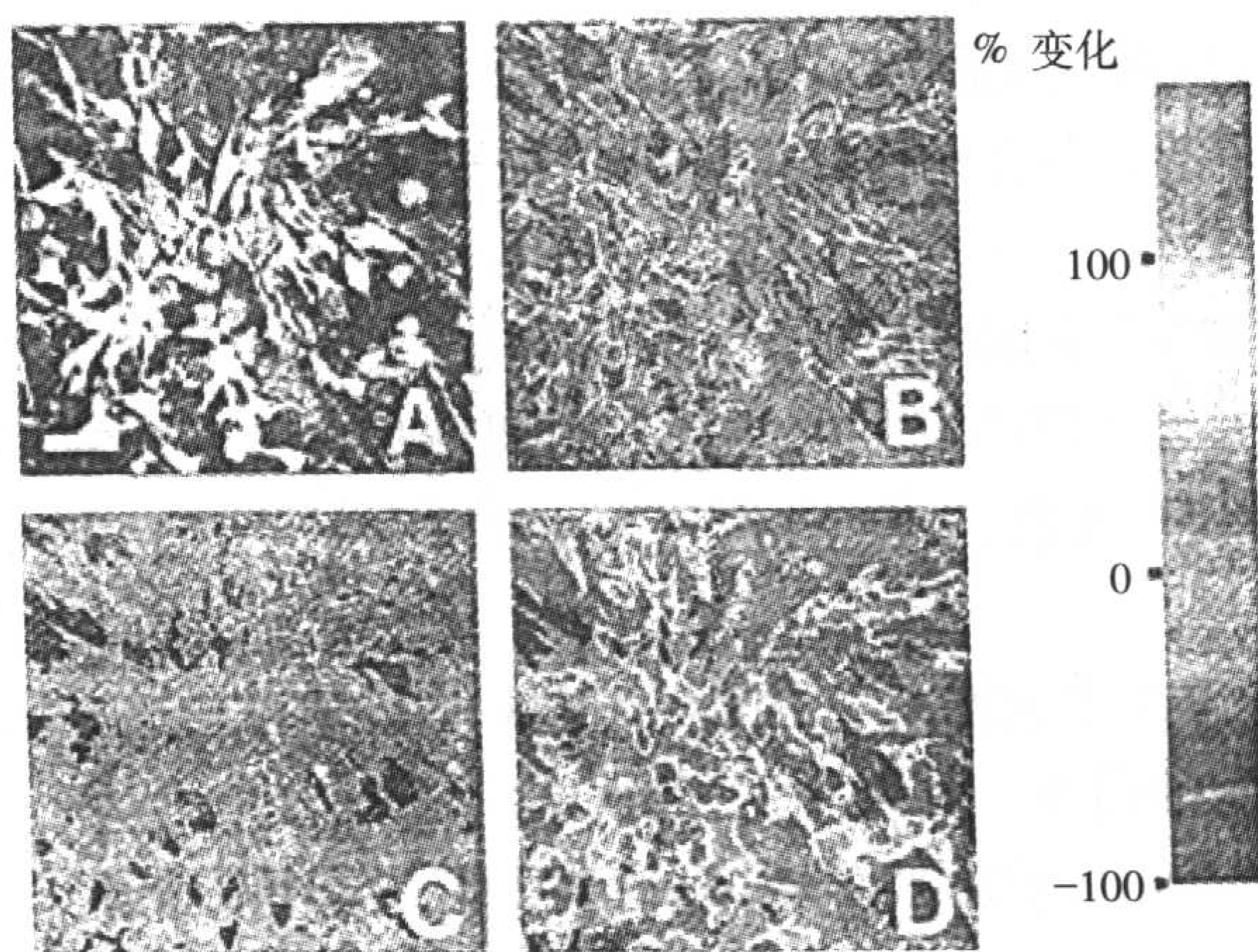


图 28.4　共培养的牛 EC 和大鼠 VSMC 中 Ca^{2+}_i 反应的二维图像(×200)[3]

激发波长为 340nm 时，处于静息状态 fura-2 标记的细胞(A)，在用 1μmol/L ATP(B)、40mmol/L KC1(C)或 30nmol/L Ang(II)(D)处理后，峰值处 F340/F380 与静息 F340/F380 相比得到的图像。标尺长度为 100μm

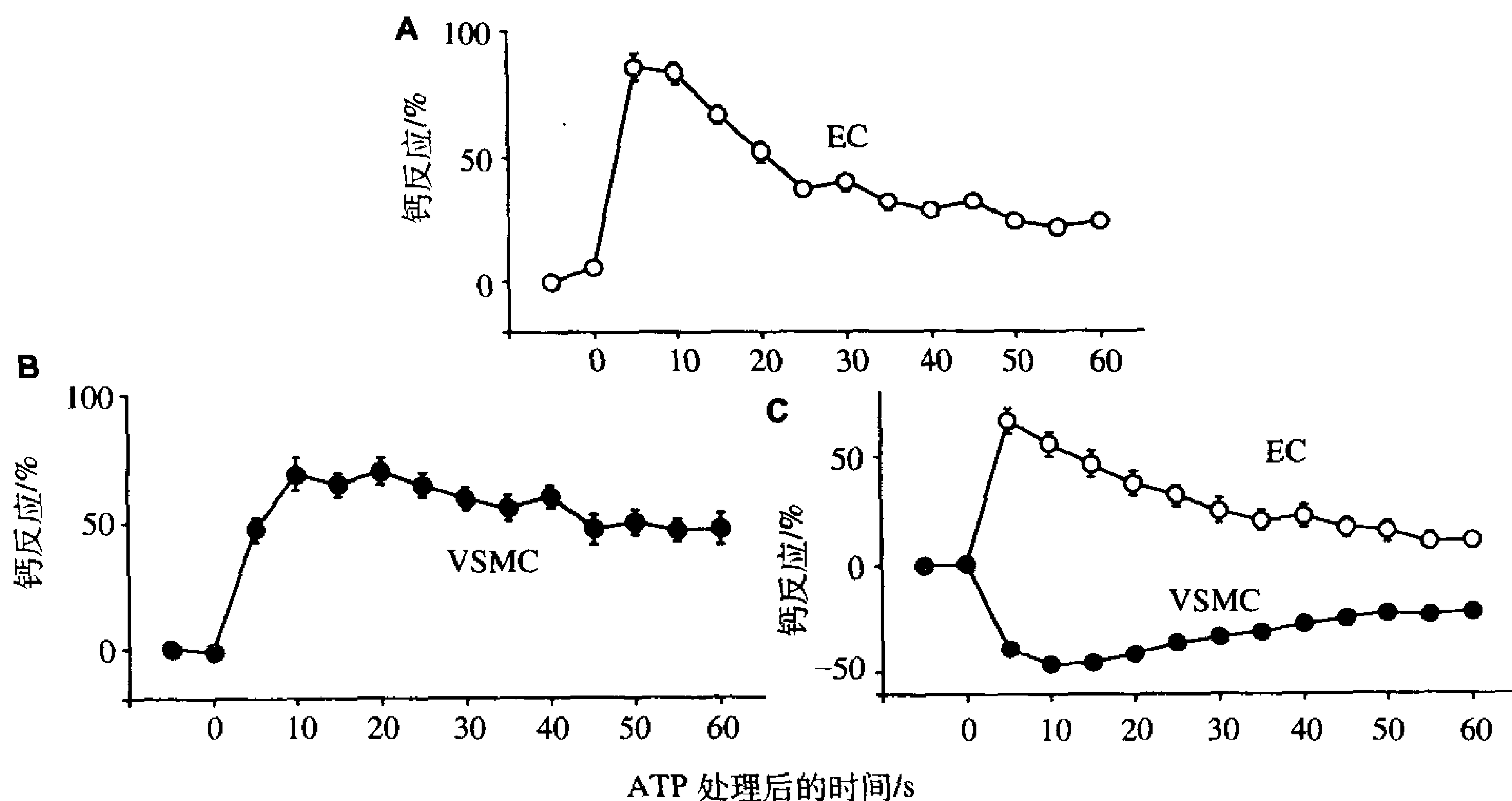


图 28.5　培养物 F340/F380 对 ATP(1μmol/L)反应的时间曲线

(A)等同培养的 EC(EC, *n*=30)；(B)等同培养的 VSMC(VSMC, *n*=21)；(C)共培养的 EC(空心点所示，*n*=27)及共培养的 VSMC(实心点所示，*n*=26)(C)(3)。每个点均表示平均值±

(4) 用 PBS(+)冲洗细胞，向培养液中加入 AngII(30nmol/L)，用受体操纵的 Ca^{2+}的通道来检测 VSMC。

4　注意事项

(1) 一只 Wistar 大鼠的主动脉，适用于一个无荧光玻璃皿载玻片进行 Ca^{2+}的检测。

(2) 以 1.5Å×10^3 个/cm^2 的密度在无荧光玻璃皿载玻片上接种细胞。

354

(3) 在同一个离心管中冲洗剪碎的降主动脉的内膜，可得到含 10~100 个 EC 的细胞团。

(4) 为了增加信噪比以及防止图像暂留，积累 2s 记录时内 1s 的 32 个连续视频图形，并计算出每个刺激波长的平均值。

(5) 用剪刀打开胸内降主动脉(2~3cm 长)，摊平，用灭菌手术刀切成碎片(多于 20 片)。

(6) 从 50mL 锥形瓶中小心地转移上清液，留下 0.5mL 上清液以防脆弱的小细胞沉淀与管底分离。

(7) VSMC 可由以下 3 条标准来识别：① 长满的培养物中出现“小山和峡谷”的形状；② 用异硫氰酸荧光素(FITC)标记的抗平滑肌肌球蛋白重链多克隆抗体干扰肌纤维膜后，肌球蛋白丝的免疫染色；③ 出现 $Ca^{2+}{}_i$ 升高或 Ang. (30nmol/L)的应用导致 K^+(40mmol/L)去极化。

(8) 在同一管中冲洗牛主动脉管，用小于 23G 的型号时会造成细胞的过度受损，而大于 23G 时会降低细胞的得率。

355

(9) 在同一离心管中冲洗剪碎的降主动脉的内膜，可获得含有 10~100 个 EC 的细胞团。

(10) EC 可由以下标准来鉴别：① 培养物中出现“鹅卵石”样物；②通过使用 FITC 标记的抗人相关因子抗原的多克隆抗体来进行 Willebrand 因子的免疫检测。实验室中使

用 6×10^5 个/cm^2 的 EC 单细胞层。在传 20 代或细胞变成扁平型或细胞对刺激剂反应不灵敏后准备 EC 的原代培养。

(11) 在显微镜下监测细胞的分散状态，细胞呈自由漂浮或流动，尽量减少细胞在胰酶溶液中悬浮的时间。

(12) 共培养需要含有 5~10 个细胞的细胞团。在原代 VSMC 培养的当日同时接种 EC 和 VSMC 会导致 EC/VSMC 的比例异常。建议使用第 2 天或更晚的原代 VSMC 来接种 EC,EC /VSMC 的比例会随 VSMC 的生长而变化。这点在 EC /VSMC 共培养中进行 $Ca^{2+}{}_i$ 图像分析是至关重要的。刺激剂可导致 VSMC 内 $Ca^{2+}{}_i$ 的减少、使 EC 释放 NO，而 EC/VSMC 比例的不足将不能清楚地显示这一变化(图 28.4B)。可以调整比例找出最佳条件(图 28.4A 显示了最佳的 EC 和 VSMC 比例)。

356

(13) 为了增加信噪比且防止图像暂留，积累 2s 记录时内 1s 的 32 个连续视频图形，并计算出每个刺激波长的平均值。

(14) 由于 fura-2 法本身存在一些固有的局限，因此不能用于检测 $Ca^{2+}{}_i$ 的绝对浓度。所以，在目前的研究中，每次激发的 $Ca^{2+}{}_i$ 增强幅度应以与静息状态下相比 F340/F380 增加的百分比来表示。

(15) 细胞受到激发后，峰值处 F340/F380 相应的增加可由虚拟光(从蓝色到绿色、黄色和棕色)在 F340/F380 的相应增加图像来表示。每个细胞在所有像素上 F340/F380 增加的平均百分率被定义为细胞 F340/F380 增加的百分率。

(16) 图 28.2~图 28.4 分别显示等同培养的 VSMC、EC 以及共培养的 VSMC 和 EC。图 28.5 所示为每种类型细胞中 Ca^{2+}反应的时间历程。

(李素敏　贾莉玮 译　戴博杰　王　莉 校)

参 考 文 献

[1] Gunther, S., Alexander, R. W., Atkinson, W. J., and Gimbrone, M. A., Jr. (1982) Functional angiotensin II receptors in cultured vascular smooth muscle cells. J. *Cell Biol.* **92**, 289-298.

[2] Tokunaga, O., Fan, J., and Watanabe, T. (1989) Atherosclerosis- and age-related multinucleated variant endothelial cells in primary culture from human aorta. *Am. J. Pathal.* **135**, 967-976.

[3] Shin, W. S., Sasaki, T., Kato, M., et al. (1992) Autocrine and paracrine effects of endothelium-derived relaxing factor on intracellular Ca2+ of endothelial cells and vascular smooth muscle cells: identification by two-dimensional image analysis in coculture. *J. Biol. Chem.* **267**, 20377-20382.

[4] Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R. Y. (1985) A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **260**, 3440-3450.

[5] Berridge, M. J. (1993) Inositol trisphosphate and calcium signaling. *Nature* **361**, 315-325.

[6] Moncada, S, Palmer, R. M. J., and Higgs, E. A. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43**, 109-142.

[7] Nathan, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* **6**, 3051-3064.

[8] Michel, T. and Feron, O. (1997) Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J. Clin. Invest.* **100**, 2146-2152.

[9] Williams, D. A., Fogarty, K. E., Tsien, R. Y., and Fay, F. S. (1985) Calcium gradients in single smooth muscle cells revealed by the digital imaging microscope using Fura-2. *Nature* **318**, 558-561.

357

359

第 29 章　建立免疫细胞与上皮细胞共培养体系

——对上皮细胞离子转运及渗透性的影响

Derek M. Mckay　Mary H. Perdue

1　引言

胃肠道上皮经常接触到多种来自饮食和肠道正常菌群的具有抗原性的和潜在的致病物质。因此，这一单细胞层上皮能将外界与机体部分隔开，组成这一单层的细胞主要包括转运肠细胞、分泌黏多糖的杯状细胞、内分泌细胞及具有防御功能的 Paneth 细胞。肠上皮细胞层具有防止潜在的有毒物质进入机体的功能，同时可以吸收营养物质。传统观点认为胃肠上皮具有稳定的内环境，不受神经中枢的调控；现在越来越多的证据显示，免疫细胞能够直接或间接调节上皮细胞功能的多个方面，包括电解质的运输、渗透性、营养物质的吸收及信号分子的合成与释放[1]。目前，对于上皮细胞免疫调节的许多结论都来自体外共培养研究，在这个系统中，模型上皮细胞与不同类型的免疫细胞或免疫介质的共同存在[2~5]。

肠组织固有的复杂性使得在体或离体分离的组织中，免疫介质或激活的免疫细胞对肠上皮细胞的影响难以检测。在介绍啮齿类和人肠上皮细胞系的时候就提到了这个问题，它有利于简化研究方法。因此，特定免疫细胞对上皮细胞的直接影响力可以在受控培养条件下进行[6~11]。

360

这里，我们描述一下评估 T 细胞和(或)单核细胞对上皮细胞功能，特别是对于离子转运(形成驱使外力直接使水分子运动)及渗透性的影响的方法，这个方法是我们在实验中大量采用的。

永生化上皮细胞系的出现和上皮细胞原代培养方法的改进对于研究上皮细胞生理的免疫调节具有重要意义。现在已清楚，各类主要的免疫细胞可以通过直接作用影响上皮细胞一方面或多方面功能，这种影响是通过细胞间的直接接触或者释放多种分子信号发挥作用的[19]。因此，应用简化的体外共培养方法，已经确定 T 细胞和单核细胞能够直接增加上皮细胞渗透性，同时引发主动离子转运[7,14]。这些模型不但可以准确分析细胞间的信号通路，而且也是检测新型治疗方法的方便工具(如改良的皮质类固醇[20])。把体内外上皮细胞与免疫细胞相互作用的实验与临床资料综合加以考虑，可极大地提高对机体生理信号通路及病理机制的认识。

2 材料

2.1 上皮细胞

根据研究目的,选择不同类型的细胞[见注意事项(1)]；购买不同类型的上皮细胞——人的 T84、Caco-2、HT-29 和啮齿动物的 MODE-K、KATO3、IEC-4.1、IEC-6、IEC-18，这些细胞具有不同的表型，可以反映胃、小肠(绒毛或隐窝)或结肠变移上皮的自然属性。另外也可以考虑采用肠上皮的原代分离物，这种细胞适合于短期研究(如几小时)。但是随着培养时间的延长，这种细胞存活率很低。肠上皮细胞的分离方法参考 Pang 等的文章[12]。

2.2 细胞培养

(1) 上皮细胞生长培养液：1 ∶ 1 配制 DMEM 和 Hams's F12，同时加入 2% $NaHCO_3$、200mmol/L *L*-谷氨酰胺,2%青链霉素(PS)，1.5% HEPES,10% 新生小牛血清。

(2) 无菌 PBS。

(3) 胰蛋白酶-EDTA。

(4) 根据细胞特殊需要添加生长因子。

(5) 塑料用品(培养瓶、12 孔培养板、吸管头、15mL 和 50mL 离心管)。

(6) 巴氏管。

(7) 带有微孔滤器的培养皿(如直径 $1cm^2$ 的培养皿，孔径 0.4μm 的滤器(COSTAR)，滤器大小、孔径尺寸及滤器的组成根据实验需要决定。

361

2.3 血液免疫细胞的分离和激活

(1) 肝素抗凝试管。

(2) 消毒的 PBS。

(3) Ficoll-Paque®(Parmacia Biotech)。

(4) 50mL 消毒塑料试管。

(5) 巴氏管。

(6) 氧化处理的 Kreb 缓冲液:115mmol/L NaCl, 8.0mmol/L KCl, 1.25mmol/L $CaCl_2$, 1.2mmol/L $MgCl_2$, 2.0mmol/L KH_2PO_4, 25.0mmol/L $NaHCO_3$, pH7.35 ± 0.02, 加入 10mmol/L 葡萄糖作为能量来源。

(7) 10mL 注射器及针头。

(8) 磁珠:MACS(Miltency Biotec，Auburn，CA，USA)。

(9) 血细胞计数器。

(10) 细菌产物：脂多糖(LPS)，金黄葡萄球菌内毒素 B (SEB)。

(11) 用 PBS 稀释 1μg/mL CD_3 抗抗体。

(12) 饱和 KCl。

(13) 丝分裂素。

(14) 培养皿。

(15) 无菌 6 孔或 12 孔培养板。

2.4 主要的仪器

(1) 离心机。
(2) Ussing 小室[World Precision Instrument (WPI)]同时配有试管和琼脂桥。
(3) 电压钳(voltage clamp,型号 DVC-100；WPI)与此匹配的放大器、甘汞电极。
(4) 加热泵。
(5) 通风设备。
(6) 数据记录仪或计算机化数据处理系统。
(7) 电压表及杆式电极(Millicel-ERS；Millipore)
(8) 无菌层流通风操作台。
(9) 消毒温箱。
(10) 显微镜。
(11) 倒置显微镜。
(12) 加热水浴锅。

3 方法

3.1 上皮细胞培养

(1) 使用人结肠隐窝上皮细胞系 T84，分析免疫细胞对单层上皮细胞离子转运及阻碍作用。

362

(2) 将 T84 细胞置于含有上皮细胞生长培养基的 75mL 培养瓶中，在标准培养条件下，37℃、5% CO_2 培养箱中培养。

(3) 进行传代时，先去掉培养液，然后用 37℃的无菌 PBS 冲洗细胞 2 次。

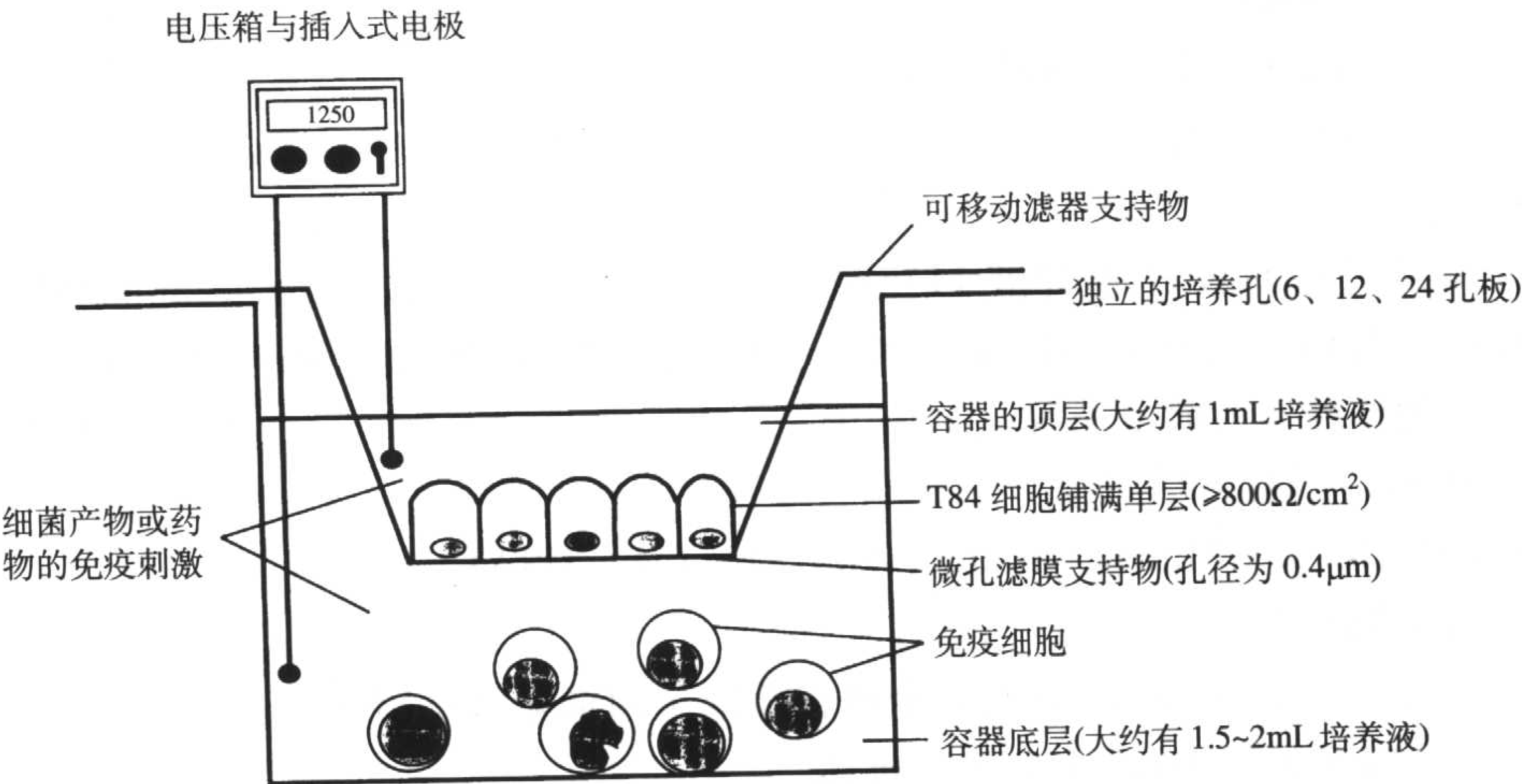


图 29.1 共培养实验装置图

图中上皮单层已生长了 5~7d，此时利用电压表可以测定跨上皮电阻≥800Ω/cm^2。将培养体系反转，细胞单层可以在滤器的下面生长

(4) 加入 5~10mL 的胰蛋白酶-EDTA。

(5) 37℃、消化 5~10min，用吸管将分离细胞吸入 50mL 的试管中。

(6) 加入 20mL 新鲜的培养液，以 100*g*(500r/min),离心 5min。

(7) 吸去培养液，然后用标有刻度吸管吸取新配制培养液慢慢重悬细胞。

(8) 用血细胞计数器计数细胞，使培养液中的 T84 细胞为 10^6 个/mL。

(9) 将 1mL 的细胞悬浮液(即 10^6 个 T84 细胞)置于滤器的微孔上[见注意事项(2)]。

(10) 加入 1.5mL 新鲜培养液置于共培养的培养皿中底层。

(11) 重新将培养皿进行孵育。

(12) 24h 或每隔 1~2d 更换顶层和底层培养液，直至上皮细胞单层形成(图 29.1)[见注意事项(3)、(4)]。

(13) 在所有的培养实验中，防止细胞污染是最关键的，研究者应该正确使用层式流动通风工作台以及掌握消毒技术[见注意事项(5)]。

3.2 血液免疫细胞的分离

下面这项技术主要是为了获得周围血液单核细胞(PBMC)，肠淋巴细胞的分离方法见参考文献[13]。

(1) 通过静脉穿刺采集大约 10mL 血液于肝素抗凝试管[见注意事项(6)]。 363

(2) 在无菌操作台，将采集血液加入 50mL 的试管中，然后加入 10mL PBS(37℃)搅匀。

(3) 通过巴氏吸管用注射器把 10mL 温的 Ficoll 加到试管底部(图 29.2)[见注意事项(7)]。

(4) 注意不要使下层搅动，加盖后，以 400*g*(1350r/min)松开刹车离心 30~40min。[见注意事项(8)]。

(5) 用吸管去掉上层，将中间层黄色液体注入新的试管中(该层中主要是 PBMC)。

(6) 加入 3~4 倍体积的温 PBS。

(7) 加盖，200~900*g*(1000~1200r/min)关闸(brake on)离心 10min。

(8) 去掉 PBS，用新鲜的 PBS 重悬浮沉淀。

(9) 再次离心，进行第 2 次洗脱，如果必要的话，需进行第 3 次离心。

(10) 用新鲜培养液重悬免疫细胞、计数、使细胞数目达到 10^6 个/mL 理想的密度。在提取 PBMC 中含有约 70%T 细胞、15%~25%B 细胞、5%~15%单核细胞，这种提取物可以作为免疫细胞的混合物使用，也可以进一步分层，一般分为：① T 、B 细胞；② T 细胞；③ 单核细胞。

a. 将 PBMC 置于消毒的培养皿在 37℃至少培养 4h，此方法可去掉单核细胞，将没有黏附的细胞收集作为 T 和 B 细胞的来源。

b. 如要进一步分离 T 细胞，根据供应商提供的使用说明，利用交联有磁珠表面抗原的特异性抗体可以非常容易地纯化 T 细胞。 364

c. 单核细胞与上皮细胞进行共培养，将合适的 PBMC 的浓度(根据 PBMC 中的免疫细胞组分的含量)，置于 12 孔板，37℃培养至少 4h，这样在这段时间，可使没有黏附的细胞与黏附的单核细胞分开[见注意事项(9)]。

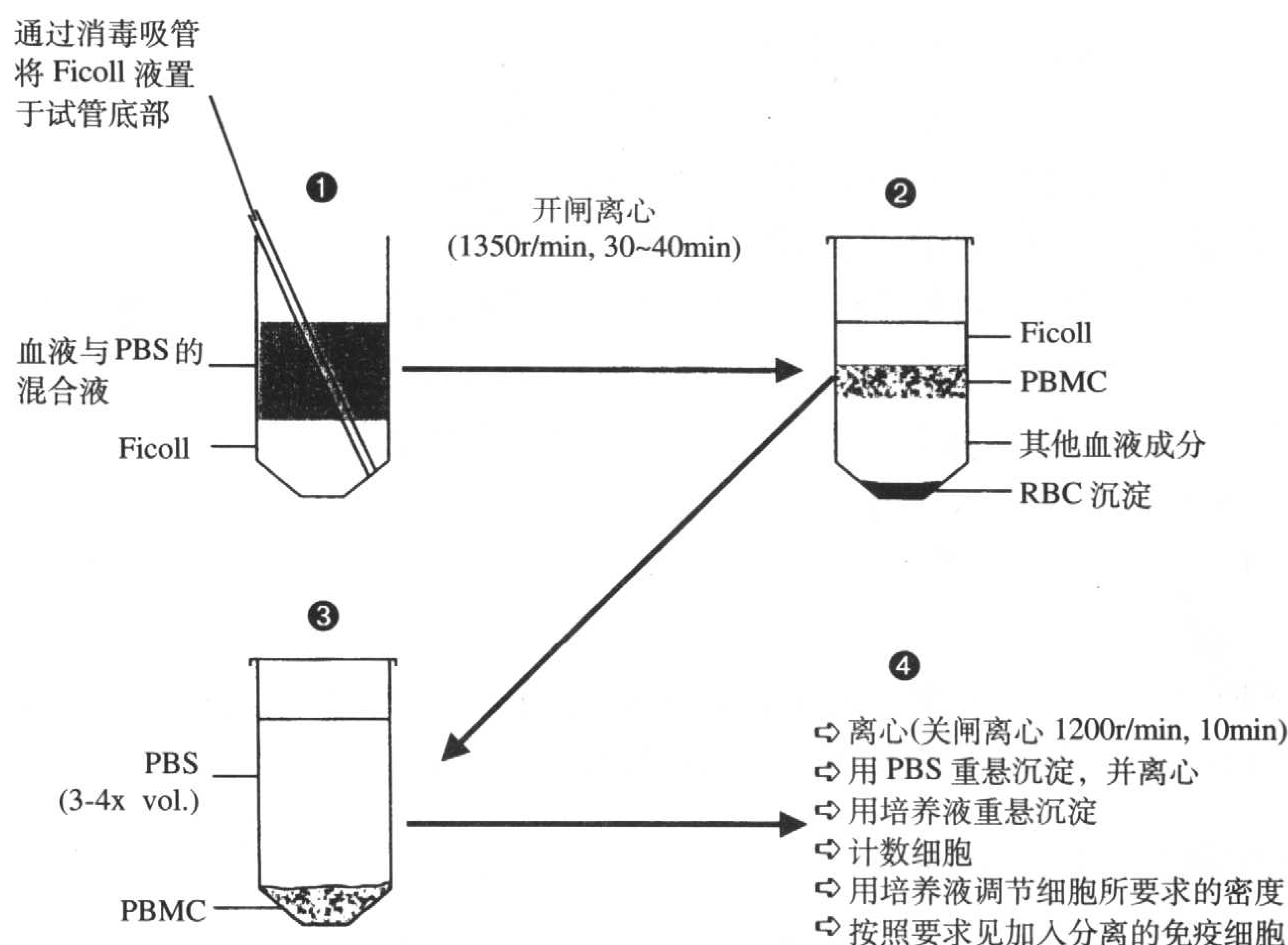


图 29.2 说明从血液分离 PBMC 的 4 个基本步骤(不代表实际大小)

3.3 上皮细胞与免疫细胞共培养及免疫激活

(1) 从含有单层 T84 细胞的培养皿中吸去顶层和底层培养液。

(2) 从顶层(容许免疫细胞与上皮细胞接触)或底层(不容许免疫细胞与上皮细胞接触)加入理想浓度的免疫细胞。

(3) 另外一种方法是将单层上皮细胞转移到新的无菌 12 孔培养板，而免疫细胞用另外的刺激因子激活，如细菌产物、丝裂原或激活的抗体。

(4) T 细胞可以被其受体-CD3 复合物激化，在共培养的培养板底层首先用 CD3 的抗抗体包被。

(5) 加入抗体 4h 后，吸去 PBS 和没有附着的抗体。

(6) 将 T 细胞和滤器上生长的单层上皮细胞加到被抗体包被的孔中[见注意事项(10)]。

(7) 共培养后，可以进行上皮细胞的离子转移及障碍功能实验，同时将未处理的上皮细胞设立对照(图 29.3)[见注意事项(11)]。

(8) 上皮细胞的其他形态和功能可以用常规方法检测，如酶活性生化分析、超微结构电子显微镜观察，以及分子表面免疫组化分析等。

(9) 在无单层上皮细胞存在的条件下，比较观察免疫细胞激活与未激活的情况。

3.3.1 条件培养液

(1) 作为一个稍加修改的实验模型，免疫细胞也可以在缺乏上皮细胞的条件下被激活，收集条件培养基。

(2) 离心条件培养液，200g(1000r/min)离心 5min，沉淀免疫细胞。

(3) 对在滤器顶层和底层的培养孔生长的上皮细胞的进行同样的处理[11,14]。

(4) 这种共培养方法具有 3 个优点：第一，在培养液中可溶性因子(细胞因子)的含量能被准确测定，用 0%~50%条件培养液就可测定剂量反应的阈值，把条件培养液的梯度剂量效应与靶因子的浓度效应进行比较，可以说明这种靶因子在条件培养液中具有增加或协同作用。第二，应用介质的特异抑制剂，如中和抗体，可以在条件培养液中鉴别某种物质活性成分。第三，在刺激前，用免疫抑制剂(类固醇、环孢霉素、花生四烯酸代谢的抑制剂)处理免疫细胞，检测来源于这些细胞的条件培养液对上皮细胞的作用。 365

3.3.2 细胞的预处理

(1) 检测上皮细胞参与调节自身屏障和转运的调节作用。

(2) 首先，上皮细胞用适当浓度抑制剂处理(类固醇[15]、蛋白质合成抑制剂、磷酸化抑制剂等)，然后既可以与激化的免疫细胞共培养，也可以在由活化免疫细胞获得的条件培养基中培养。

(3) 这样，通过应用 3.3~3.3.2 中的方法，可以确定调节上皮细胞离子转运及渗透作用的免疫细胞，免疫细胞产生的介质及由某种物质引发的免疫细胞激化后的肠上皮细胞自身主动参与作用。 366

3.4 通过 Ussing 小室分析上皮细胞离子的转移及渗透性

(1) 肠上皮细胞的两项基本功能是矢量电离转移以及调节屏障的维持；用 Ussing 小室，固定预处理研究对象(组织切片、滤器上生长单层上皮细胞)就可以明确上皮细胞的这些特点。

(2) 在小室的白榴石阀(lecuite halves)之间固定上皮细胞。

(3) 在小室两侧，加入等体积的 Kreb 缓冲液(或其他生理缓冲液)。这样，流体静力作用、化学因素，以及渗透梯度都不可能影响上皮细胞[见注意事项(12)]。

(4) 小室的每一部分配有两个琼脂桥口，它们通过饱和 KCl 液与甘汞电极或银-银电极相连来分别测量电压差及注入电流。

(5) 靠近上皮细胞顶层或底层的一对电极可以测量在自然状态下的电压；而相距较远的电极测量注入电流(图 29.3)。

(6) 利用电压钳自动设置，使其显示跨细胞电压为零(这样可以消除电子引起的不良影响)，注入电流的值使电压为零，产生瞬间短路(Isc，用$\mu A/cm^2$表示)。这样注入电流显示研究对象的净离子的量。而 Isc 值的改变说明加到特定上皮细胞表面可以模拟生理状态的分泌和吸收的试剂的作用。

(7) 细菌产物，如霍乱毒素，应加到单层细胞顶层的培养液中，而将免疫介质如组氨酸加到上皮浆膜侧的缓冲液中。

(8) 电解质转移形成一种外力促使水分子运动，而在机体内这样有可能导致腹泻或便秘。

(9) Isc 只能显示净电荷运动，并不能分清是由哪种离子引起[见注意事项(13)]。

(10) 另外，由于电压钳设备可以提供电压和电流，这样可以确定电流通过上皮或组织产生的阻力(用Ω/cm^2) 表示或它的传导性(用 mS/cm^2 表示)。

(11) 跨上皮细胞电阻显示小室两侧存在被动离子流，进一步说明在细胞间存在紧密

的连接关系。

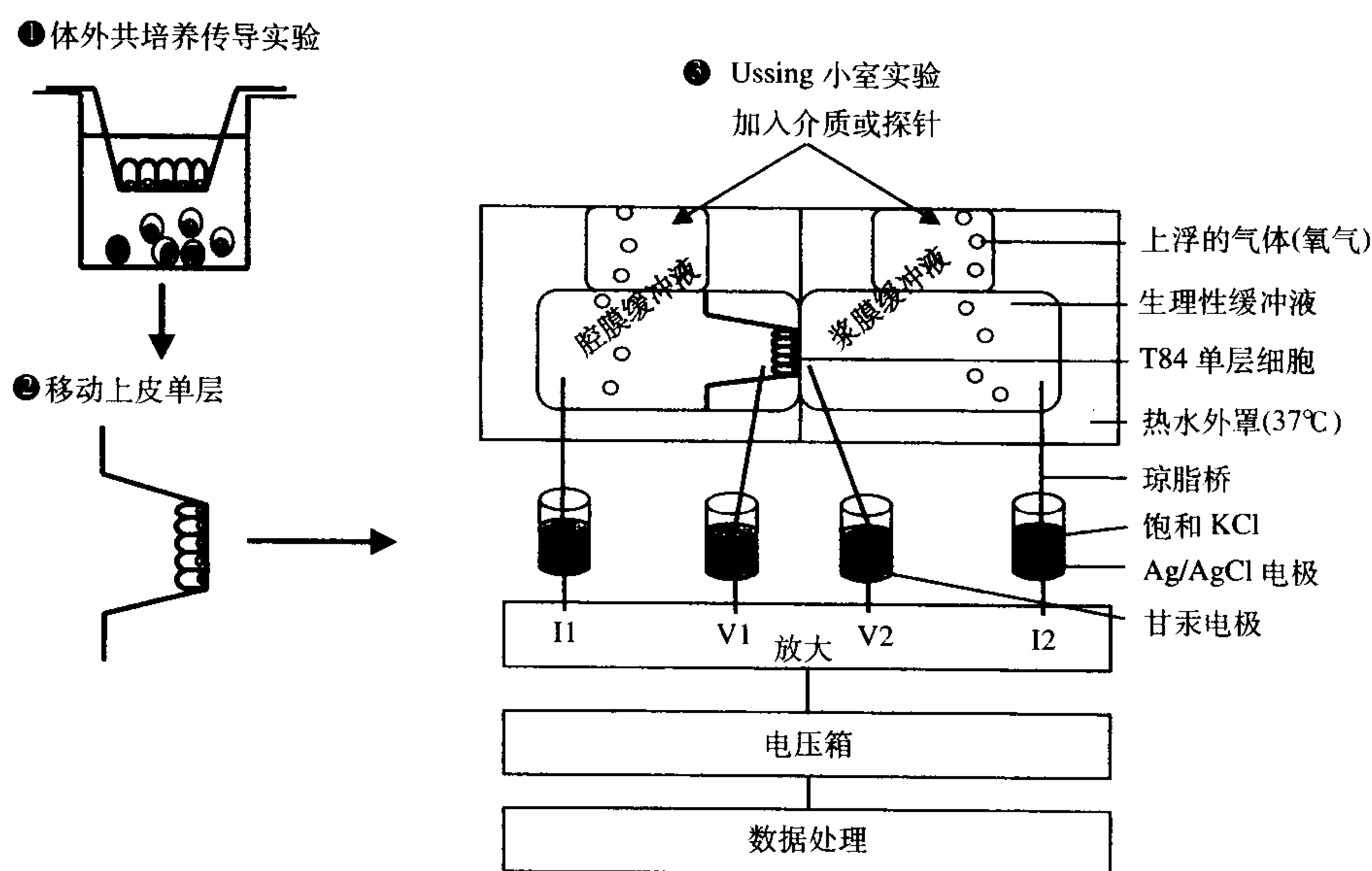


图 29.3 图示共培养和 Ussing 小室-电压系统对上皮离子转移及渗透性的测定装置(I：电流；V：电压)

367

(12) 在小室中固定装置，可以有效地将上皮的黏膜与浆膜分开，这样可以检测标记分子的单项、双项及跨上皮细胞流。

(13) 在小室一侧加入特定大小标记分子(如 ^{3}H-甘露醇、^{51}Cr-EDTA、荧光素标记和蛋白质)，作为热处理的一面，需经过一段平衡期(在 20~40min)；而小室的另一面，即为冷的一面。在 90min 内，每隔 30min 取一次样品。同时加入等体积的生理缓冲液[见注意事项(15)]。在实验开始和结束时，分别从热面取出样品，分析测定标记物的活性；用标准离子流公式计算或测出冷面缓冲液样品中的总量。跨上皮转移的探针流量可以用流量/单位面积、单位时间表示；如果是离子流可以转换成微平衡电子，用μE · h · cm^2 表示[16]。

4 注意事项

(1) 研究的性质决定了细胞系的选择。人肠上皮细胞(Caco-2、HT-29、T84)形成的单层细胞电阻较高(一般大于 200Ω/cm^2，而对于 T84，可能达到 3000~4000Ω/cm^2)，并且显示了与分离组织分泌功能相似的离子转运。因此，这种模型适合分析免疫细胞对上皮细胞的离子转运及渗透作用。改变 Caco-2 细胞的培养条件，可以促进绒毛样细胞的分化，进而使刷状缘表达蔗糖酶 [17]。这有利于比较 Caco-2 类隐窝细胞与类绒毛细胞。另外 HT-29 细胞亚系可以作为黏液分泌细胞的模型使用。如果实验重点不是研究离子转运及渗透性，则可使用其他上皮细胞。如在研究上皮细胞的细胞因子产物时，就可以使用啮齿类的肠上皮细胞。另外，来源于正常鼠或具有各种分泌功能患有肠炎动物的肠或免疫细胞(LPL 和 IEL)，也有其独特的优点。

(2) 其他研究者在 Ussing 小室的滤器上种植低浓度(2.5×10^5~5×10^5)的 T84 细胞。因此，如果要在培养皿中得到低产量的细胞或者需要大量细胞单层时，就要采用低密度细

胞接种。

(3) 当使用 T84 细胞时，研究者必须设立对照单层。这主要决定于培养的时间(大于 7d)或跨上皮的电阻(T84 细胞单层电阻大于 80Ω/cm^2)。倾向于采用后者，因为它有利于用电压仪和非对称电极更方便地记录单层每天的电阻值(图 29.1)。在使用电极时不要搅动或刺破细胞单层。

368

(4) Madara 等[8]和其他研究者对该方法进行修改，将 T84 细胞培养在滤器支持面的下方(图 29.1)。用这个方法，须将无菌滤器倒置于烧杯中，将密度为 10^5 个/100μL 的细胞加入滤器中，石蜡封闭烧杯，放进培养箱。在以后的黏附阶段(4h)，将培养液加入烧杯的内侧和滤器内。最后将滤器内的 T84 单层细胞置于 12 孔培养板，上皮细胞在滤器的下面生长，其顶面对着培养物的底部，免疫细胞可以加到 Transwell 的顶部小室(与上皮细胞底膜相邻)，这种方法可以研究免疫细胞的跨上皮细胞迁移，可以在 Transwell 的基底部小室收集免疫细胞。

(5) 细菌和真菌是培养细胞死亡的主要因素。研究人员应该熟悉污染的迹象，其主要的特征为培养液变得模糊不清，出现云雾和刺鼻的气味。应丢弃所有污染的培养物，培养箱要用漂白剂除菌。应用 *Limulus* amebocyte assay 方法检测污染培养物的细菌产物 LPS；真菌污染可以用商用试剂盒测定。一个预防污染的步骤是，在采用新的培养基和血清之前我们会将其孵育 24h，检测它们是不是被污染。

(6) 在使用自愿者的血液时，获得的 PBMC 的具体组分有很大差异。为了减小差异，我们尽量不采纳近期或正在服药的(如感冒、过敏)的志愿者。

(7) 在使用 Ficoll 时，应该摇匀。

(8) 要注意，离心 Ficoll/血液/PBS 混合物时，要关掉离心机的刹车。如果开刹车离心，样品有可能丢失，之后即使再采用关刹车离心，也无法分离血液获得 PBMC。

(9) 在分离单核细胞时，最初黏附可以激活单核细胞，因为这些细胞变得更像巨噬细胞。因此，我们建议在黏附 4h 后，细胞应给予新鲜的培养液，并且在 37℃孵育过夜。第 2 天更换培养液，细胞可以用来共培养[7]。

(10) 抗 CD3 抗体的固定非常重要，它可以促进 CD3 交联并附着在 T 细胞表面，激活细胞。使用可溶的抗 CD3 抗体，T 细胞很少被激活。

(11) 我们和其他的研究者注意到，不同批次和同一细胞系的不同传代数的 T84 单层跨上皮细胞电阻和对 Ca^{2+}和 cAMP 介导的 Cl^-分泌的反应有很大差异。因此认为在每次实验应该至少设置 2 组天然的对照单层，这样有利于数据的标准化，将结果显示为对照反应百分比的形式，再进行适合的统计分析。

369

(12) 从 Ring 到 Hank 平衡液，有许多生理缓冲液可供研究使用。我们平时大都使用的氧化性 Kreb 缓冲液。如果是检测小肠上皮，就可以用甘露醇来代替含有葡萄糖的腔面缓冲液。这是因为葡萄糖支持离子-葡萄糖的摄入，因此会增加 Isc 的值。

(13) 以用许多方法鉴别引起的 Isc 改变的离子种类。浴缓冲液可以用于 Ussing 小室研究，去除这种缓冲液中的特定离子，并用带有相似电荷离子代替之，以维持电荷的平衡(无 Cl^-缓冲液)[18]。也可以用离子通道或离子泵(Cl^-或 Na^+通道阻断剂，抑制基底外侧的 Na/Cl/K 共转移部位)被特异药理阻断剂阻断的方法；使用放射性标记的离子，如 ^{36}Cl、^{126}I、^{22}Na、^{86}Rb 和其他双项直接流动的方法进行研究(见 3.4)，可以明确 Cl^-、Na^+和 K^+

运动对 Isc 值变化的影响。

(14) 另外，可以使用差值脉冲技术来测定跨单层上皮细胞的电阻。电压钳被设置在双电极制式，电压为 1mV(或更高)，时间为 1s 的不同间隔(从秒到分钟均可)。从 0~1mV 自动跳跃测得电流尖脉冲，通过欧姆定律来计算电阻。由于这种方法不依赖测试者人为改变电压钳的状态，即从关闭模式到开放电流位置，因此这种测定电阻的方法经常应用。由此获得的读数也更精确，在平行实验中所有上皮的受检时间也可同步化。

(15) 对于观察放射性标记离子或标志分子移动的流量实验而言，实验必须要在上皮两侧体积相等的前提下开始，还要维持整个实验过程中体积不变。过度吹吸或者任何一侧的缓冲液泄漏都会导致数据失效。缓冲液的体积减少会导致计数减少和(或)在冷的缓冲液的流率降低。硅油可用于防止在热缓冲液中加入探针前的预平衡阶段发生的渗漏。

致谢

该项研究在作者的实验室完成,获得了 CCFC 和 MRCC(to D.M.M.和 M.H.P.)开放奖学基金以及 AD/PILS(to M.H.P.)研究经费的资助。

(沈 政 译 刘为敏 王 莉 校)

370

参 考 文 献

[1] Perdue, M. H. and McKay, D. M. (1994) Integrative immunophysiology in the intestinal mucosa. *Am. J. Physiol.* (*Gastrointest. LiverPhysiol.*) **267**, G151-G165.

[2] McKay, D. M. and Baird, A. W. (1999) Cytokine regulation of epithelial permeability and ion transport. *Gut* **44**, 283-289.

[3] Sanders, S. E, Madara, J. L., McGuirk, D., Gelman, D., and Colgan, S. P. (1995) Assessment of inflammatory events in epithelial permeability: a rapid screening method using fluorescein dextrans. *Epithelial Cell Bioi.* **4**, 25-34.

[4] Yang, S.-K., Eckmann, L., Panja, A., and Kagnoff, M. F. (1997) Differential and regulated expression of C-X-C, C-C and C-chemokines by human colon epithelial cells. *Gastroenterology* **113**, 1214-1223.

[5] Schmitz, H., Fromm, M., Bentzel, C. J ., et al. (1999) Tumor necrosis factor-alpha (TNFα) regulates epithelial barrier in the human intestinal cell line HT -29/B6. *J. Cell Sci.* **112**, 137-146.

[6] McKay, D. M., Croitoru, K., and Perdue, M. H. (1996) T cell-monocyte interactions regulate epithelial physiology in a co-culture model of inflammation. *Am.J. Physiol.* (*Cell Physiol.*) **270**, C418-C428.

[7] Zareie, M. Z., McKay, D. M., Kovarik, G., and Perdue, M. H. (1998) Monocyte/ macrophages evoke epithelial dysfunction: indirect. role of tumor necrosis factorα . *Am. J. Physiol.* (*Cell Physiol.*) **275**, C932-C939.

[8] Madara, J. L., Patapoff, T., Gillece-Castro, B., Colan, S. P., Parkos, C. A., Delp-Archer, C., and Mrsny, R. (1993) 5'-Adenosine monophosphate is the neutrophil derived paracrine factor that elicits chloride secretion from T84 intestinal epithelial cell monolayers. *J. Clin. Invest.* **91**, 2320-2232.

[9] Resnick, M. B., Colgan, S. P., Patapoff, T., et al. (1993) Activated eosinophils evoke chloride secretion in model intestinal epithelia primarily via regulated release of 5'-AMP. *J. Immunol.* **151**, 5716-5723.

[10] Baird, A. W., Cuthbert, A., and MacVinish, L. (1987) Type 1 hypersensitivity reactions in reconstructed tissues using syngeneic cell types. *Br. J. Pharmacol.***91**, 857-869.

[11] Taylor, C. T., Murphy, A., Keller, D., and Baird, A. W. (1997) Changes in barrier function of a model intestinal epithelium by intraepitheliallymphocytes requires new protein synthesis by epithelial cells. *Gut* **40**, 634-640.

[12] Pang, G., Buret, A., O'Loughlin, E., Smith, A., Batey, R., and Clancy, R. (1996) Immunologic, functional, and morphological characterization of three new human small intestinal epithelial cell lines. *Gastroenterology* **111**, 8-18.

[13] Coligon, J. E., Kruisbeek, A. M., Margulies, D. H., Shevach, E. M., and Strober,W. (1998) *Current protocols in immunology*, p.

3.19.0-1.19.11. John Wiley &Sons, New York.

[14] McKay, D. M. and Singh, P. K. (1997) Superantigen-activation of immune cells evokes epithelial (T84) transport and barrier abnormalities via interferon-γ and tumour necrosis factor-α. Inhibition of increased permeability, but not diminished secretory responses. by transforming growth factor β_2. *J. Immunol.* **159**, 2382-2390.

[15] McKay, D. M., Brattsand, R., Wieslander, E., Fung, M., Croitoru, K., and Perdue,M. H. (1996) Budesonide inhibits T cell initiated epithelial pathophysiology in an *in vitro* model of inflammation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **277**, 403-410.

[16] Karnaky, K. J .(Jr.) (1992) Electrophysiological assessment of epithelia, p. 257-273.In *Cell-cell interactions. A practical approach* (Stevenson, B. R., Gallin, W. J., and Paul, D. L., eds.). PIRL Press at Oxford University Press, Oxford.

[17] Abraham, C., Scaglione-Sewell, B., Skaroski, S. F., Qin, W., Bissonnette, M., and Brasitius, T. A. (1998) Protein kinase Cα modulates growth and differentiation in Caco2 cells. *Gastroenterology* **114**, 503-509.

[18] Saunders, P. R., Kosecka, U., McKay, D. M., and Perdue, M. H. (1994) Acute stressors stimulate ion secretion and increase epithelial permeability in the rat intestine. *Am. J. Physiol.* (*Gastrointest. Liver Physiol.*) **267**, G794-G799.

[19] McKay, D. M., Philpott, D. J., and Perdue, M. H. (1997) In vitro models in inflammatory bowel disease research-a critical review. *Aliment. Pharmacol. Ther.*(suppl. 3)**11**, 70-80.

[20] Zareie, M., Brattsand, R., Sherman, P., McKay, D. M., and Perdue, M. H. (1999) Improved effects of novel glucocorticosteroids on immune-induced epithelial pathophysiology. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **289**, 1245-1249.

373

第 30 章　胚胎上皮细胞的外植体培养

——间充质信号的分析

Carin Sahlberg, Tuija Mustonen, Irma Thesleff

1　引言

大多数器官发育的主要特征是器官上皮形态发生，包括上皮出芽、分支及折叠，在此过程中伴随着上皮细胞的生长和分化。调节器官发育的主要机制是上皮细胞与间质之间的相互作用。要研究它们之间相互作用的本质就需要分离相互作用的组织，在用多种方法处理后进一步观察其发育状况。这些组织既可以移植在体内发育，也可以在体外培养。尽管移植方法具有一定的优点，如时宜的生理环境，具有长期连续观察的可能性，但是器官培养技术在其他方面具有更多的优点。体外培养有利于不断监测组织发育。组织培养条件能够重复，培养液含有已知准确含量的组成成分，而且组分可以改变。最重要的是，可以使用多种可控手段处理组织。分离的胚胎上皮可以与不同的组织、细胞组合培养，或者在不同的细胞间基质上培养。体外培养条件尤其适合分析间质诱导信号作用，这些信号可以添加在培养基中或通过引入磁珠或转染细胞实现。

多年以来，多种器官培养体系被应用于胚胎器官发育的研究。Trowell 方法[1]被广泛使用，已经证实该方法适宜分析多种不同器官的形态发生[2~7]。在这个系统中，外植物在体外培养于薄膜滤器的液气相界面，滤膜用金属架支持。Saxen[8]对 Trowell 方法进行了修改，我们用修改后的方法来研究胚胎牙齿发育不同阶段组织间的相互作用机制[9~16]。上皮与间质相互作用调节组织形态发生和细胞分化，牙齿发育就是典型的例子。本章描述了牙齿上皮和间质组织的分离与培养方法，并用磁珠法或转染细胞来分析信号分子的局部作用(图 30.1)。

374

2　材料

所有的溶液与器材均是无菌的。玻璃与金属器械用高压锅消毒；溶液也需要过滤或高压灭菌，这些工作需在层式流动通风橱内进行，解剖镜也置于通风橱中。

375

2.1 试剂

(1) PBS，pH7.4。

(2) 含有 20IU/mL 青链霉素(PS)(青霉素 10 000IU/mL，链霉素 10 000IU/mL；Life Technologies)的 D-PBS(Life Technologies)。

(3) 组织分离酶液：胰蛋白酶(Difco,cat.no.0152-15),胰酶(Life Technologies, cat.no.45720-018)的储存液浓度是 1.25g/mL。Tyrode 溶液：8.0g NaCl, 0.2g KCl, 0.05g

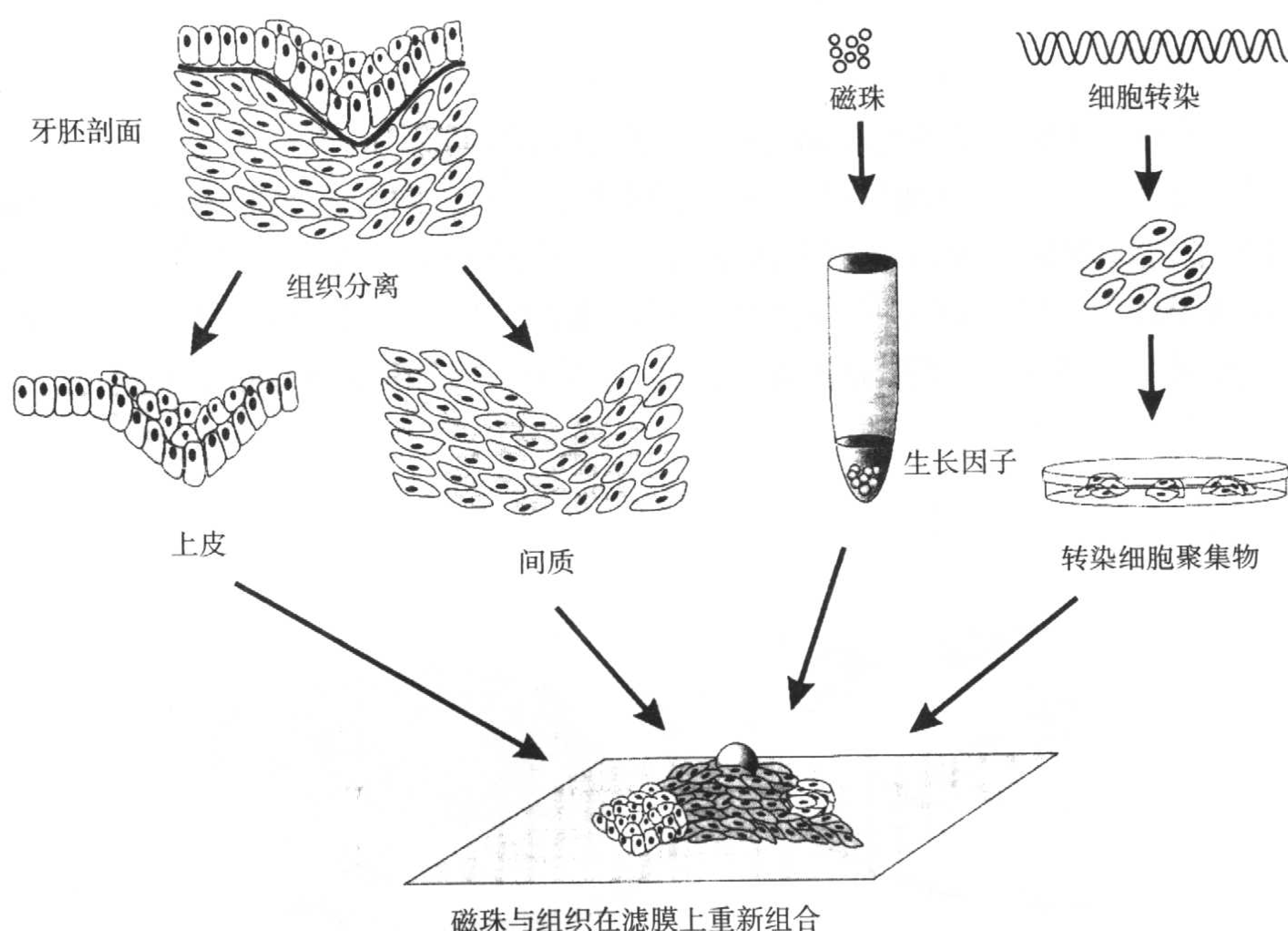


图 30.1　组织分离和培养

NaH_2PO_4，1.0g 葡萄糖，1.0g $NaHCO_3$，调节 pH7.2，用蒸馏水配制 1000mL，过滤消毒，4℃储藏。在冰上用 6mL Tyrode 溶液溶解 0.225g 胰蛋白酶，用磁力器搅拌；加入 1mL 胰酶和 20μL PS，用 NaOH 调 pH7.4，最后用 Tyrode 溶液定容至 10mL，过滤消毒，用 1mL 的 Eppendorf 试管分装，储藏在−20℃；酶溶液可以在−20℃储藏一周。

(4) 组织培养液：DMEM (含有 glutaMAX-1, Sigma, cat.no. D7777)；10%FCS 和 PS；在 4℃储藏[见注意事项(6)]。

(5) 用 PBS 配制 0.1% BSA。

(6) 生长因子。

a. 20ng/μL FGF-4。

b. 1ng/μL TGFβ-1。

2.2　取材与培养

2.2.1　组织取材

(1) 10cm 的塑料细菌培养皿。

(2) 4~10cm 玻璃培养皿。

(3) 小剪刀。

(4) 镊子。

(5) 20~26 号针头和 1mL 的塑料注射器。

2.2.2　细胞培养

(1) 培养皿：3.5cm 塑料培养皿(细菌或细胞培养皿)。

(2) 金属架子：不锈钢网直径为 3cm，圆盘状，周边向上卷起形成高度为 3mm 的架子(金属架子可以根据培养液的多少改变高度)；不锈钢架子的孔可以用钉子钉穿或直接打孔，有利于培养拍照和研究[见注意事项(5)](图 30.2)；另外从商业途径可以买到器官培养皿，其中央有一个可以放置金属架子的孔 (Falcon3037;Becton Dickinson)。

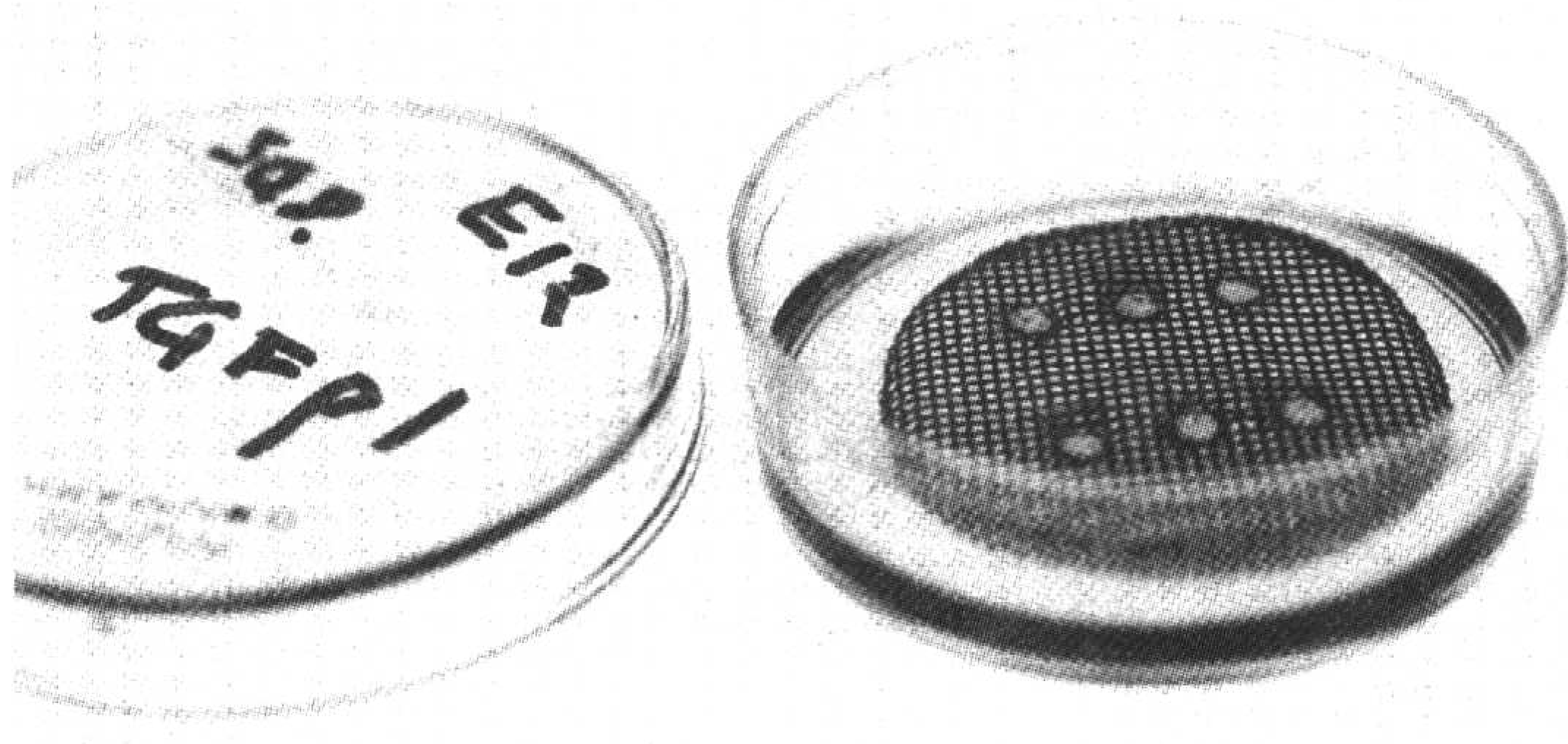


图 30.2　Trowell 法器官培养皿

金属架有 6 片滤膜。通过金属架小洞上覆盖的滤膜可以看到体外培养的组织

376

(3) 过滤：微孔多碳酸滤膜(0.1μm)(Nuclepore Track-Etch membrane：Whatman，cat.no.110 605)孔大小为 0.1μm [见注意事项(4)]；滤纸对折冲洗清洁，用流水冲洗 2h，蒸馏水冲洗大约 10 次，置于 70%乙醇储藏。

(4) Matrigel (Collaborative Biomedical Product)保存在冰箱中，或用冰盒保存在通风橱中。

(5) 转移组织的玻璃消毒管。巴氏管需要硅化(防止黏附组织)，用棉絮填充，然后高压消毒；在使用前，通过加热调整孔径大小与组织相一致，最理想的是孔径应尽可能的小，组织可以用镊子和滤纸移动。

(6) 生长因子与磁珠：琼脂糖凝胶磁珠(Bio-Rad)或肝素丙烯酸磁珠(Sigma)进行分装，4℃储藏。

3　方法

3.1　磁珠处理

(1) 将琼脂磁珠或肝素丙烯酸磁珠置于含有 PBS 的培养皿中。

(2) 在显微镜下计数 100~200 个磁珠，置于 Eppendorf 管中。

(3) 离心磁珠，去掉 PBS。

(4) 在含有 0.1% BSA 的 PBS(10~50μL)中加入生长因子。在我们的实验中，一般采

用高浓度的生长因子，FGF-4 浓度为 20ng/μL，TGFB-1 的浓度为 1ng/μL。

(5) 在含有 0.1% BSA 的 PBS(10~50μL)中只加对照磁珠。

(6) 在 37℃温育 30min，4℃储藏；处理好的磁珠至少可以用 14d(主要取决于蛋白质的稳定性)。 377

3.2 细胞聚集物的准备

(1) 为了使聚集细胞更多地表达蛋白，在细菌培养皿中过量种植细胞(75cm^2 培养瓶中的铺满细胞可以移入 2 个 6 cm^2 的培养皿中)。

(2) 由于细胞不能黏附在培养皿上，所以有可能在 48h 内形成漂浮的细胞团。

(3) 聚集物可以用移液器或微型吸管接种在培养的组织上[15,16]。

3.3 组织培养皿的处理

(1) 从乙醇中取出一片微孔滤纸，置于含有 PBS 的培养皿冲洗几次。

(2) 用剪刀和镊子将滤纸剪成 3mm×3mm 大小，从 PBS 中取出。

(3) 在 3.5cm 培养皿中放置金属架子。

(4) 加入 2mL 的 DMEM[含有 10% FCS；见注意事项(6)]，培养液的表面应接触架子平面，但是不能覆盖(太多的培养液引起组织和滤纸飘动)，金属架子下不应该有气泡(如果有，用巴氏吸管吸出)。

(5) 使用镊子将微孔滤纸置于架子的洞上。

(6) 在滤纸上置于冰冷的 Matrigel。

(7) 将包被 Matrigel 的培养皿温育 10min。

(8) 在通风橱中将组织置于 Matrigel 上[见注意事项(7)]。

3.4 组织的分离

(1) 将小鼠的子宫置于含有 D-PBS 的 10cm 的塑料培养皿，用剪刀和镊子将子宫壁切开，置于体视显微镜下。

(2) 将胚胎移出，置于新鲜的 D-PBS 中。

(3) 用针头去掉胚胎的头，用于以后的操作。

(4) 将小鼠头置于含有 D-PBS 的玻璃培养皿中，解剖露出下颌骨。

(5) 进一步暴露下颌骨第一臼齿左边牙胚 [见注意事项(1)和(2)]。

(6) 将牙胚移入小的培养皿中。

(7) 吸出液体。

(8) 将胰蛋白酶加入到含有牙胚的培养皿中。

(9) 在室温或 37℃温育 2~10min。 378

(10) 尽可能去掉液体，加入新的培养液混合，然后将牙胚置于含有培养液的玻璃培养皿中。

(11) 让组织在室温下至少作用 30min。

(12) 用针头从间质组织中分离上皮细胞，将多余的非牙齿组织去掉[见注意事项(3)]。

(13) 将组织置于提前准备好的微孔滤纸上，在滤纸或镊子间微毛细管外力的作用

下，组织被托起。如果使用玻璃移液管，要避免管中的气泡，最好将组织一次放好，如果有必要，可以用针头轻轻移动。

(14) 如果使用磁珠，应该在培养皿中用 PBS 快速冲洗(它们有可能黏附在塑料皿上)。

(15) 在显微镜下，将磁珠或转染细胞与组织聚集体转移组织上，一次仅转移一个磁珠或一个细胞聚集体。

3.5 培养与固定

(1) 组织应在 37℃、5%CO_2、90%~95%湿度的培养箱培养 24h。

(2) 在固定前拍照(固定后透明度即消失)。

(3) 为避免组织与滤纸分开，应在架子上用冰甲醛预固定，方法如下：

a. 将培养液吸出，然后向组织慢慢加入甲醛。

b. 5min 后，用镊子将滤纸移去，置于 Eppendorf 管[见注意事项(8)和(9)]。

c. 典型的培养形状如图 30.3 所示[见注意事项(10)]。

379

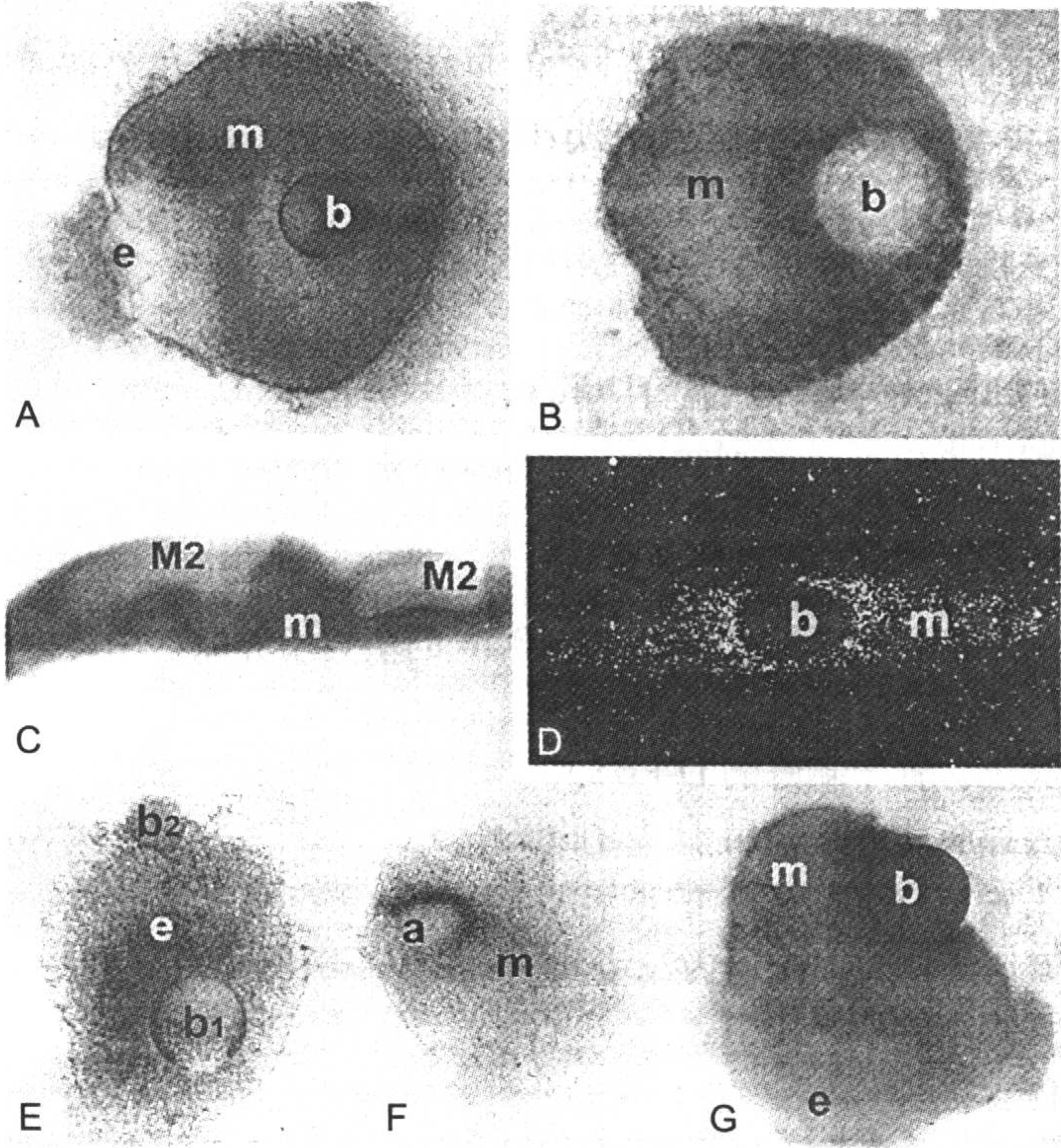


图 30.3 体外培养的分析举例

(A)立体显微镜下外植体的形状。在磁珠上的 FGF-4 与上皮诱导牙间质出现半透明带。(B) 在释放 FGF-10 的磁珠周围，用 BrdU 作用定位增生的细胞。(C) 400μm 培养牙组织超薄切片后，以 Runx2 为探针进行全固定原位杂交。(D) 石蜡切片原位杂交分析显示 TGFβ-1 释放磁珠诱导 tenascin-C 的表达。(E) 含有 FGF-4 释放磁珠(b_1)的上皮 E13 诱导 Lunatic Fringe 的转录，而含有 BMP-4 的磁珠(b_2)则不能诱导 LF 转录。(F) wnt6 共培养的牙组织(E12)，释放细胞凝聚物，用外胚层介质探针原位杂交分析。(G) 全固定免疫组织化学方法显示，在 FGF-4 释放磁珠周围间质的 tenascin 表达增加。e,牙齿上皮；m,牙间质；b,磁珠；M1,第一臼齿；M2,第二臼齿

4 注意事项

(1) 用针头来分离组织比其他器械，如解剖刀或虹膜刀要好，因为它们无需磨尖或消毒。针头的规格根据组织的大小选定；注射器不需要特别消毒，可多次使用。为了最好的保持组织活力，组织分离时要采用切割的手法，而不是撕扯；培养皿最好是玻璃制品，因为针头会刮擦塑料平面，造成表面物质脱落。

(2) 组织的分离应尽可能快速，以提高组织的存活率。应一次准备一条子宫，将其余的在 4℃ D-PBS 中保存；分离后的组织，在转移培养前，最好不要保存时间太长(不能超过 2~3h)。

(3) 分离、培养不同器官和不同发育阶段的牙胚组织采用的方法、技术基本相似。 380
分离的组织最好是幼年的上皮与间质，经过酶处理的组织仅通过旋转就可使组织分离；另一方面，有许多组织需要在酶溶液中长时间温育(10min)。分离的最好时间也决定于酶的批次，因此，对于不同的酶及不同的组织要检测最佳消化时间。

(4) 对外植物的培养应使用不同的支持物。较大的组织用透镜纸；培养液在支持物上应该易于扩散。厚度 100μm 的 Mollipore 滤纸不适用 (Nucleopore 滤纸的厚度大约是 10μm)。可以使用不同孔径的 Nucleopore 滤纸。小孔(0.05~0.2μm)的滤纸更适合在采用透射光的立体显微镜下观察外植物，但是固定或经其他方法处理后，组织很容易与滤纸分离。因此，这种情况下，更合适使用大孔径滤纸，这主要取决于实验需要。

(5) 应用 Trowll 可以培养的器官类型很多。如采用跨滤膜培养法，相互作用的组织分别培养在滤纸的两侧[4,9]。使生长在滤膜下方的组织粘贴在加热过的 1%琼脂上，然后将滤纸反转，另一种组织培养于滤纸的上方。

(6) 最佳培养基的组成成分决定于组织类型。本方法提供的配方适宜于培养发育初期的不同组织，随着进一步的发育，有些组织有特殊的要求。对于牙胚的培养，我们选择的是 DEME 和 F12(1 : 1)，另添加 50μg/mL 的转铁蛋白(transferrin)(10mg/mL，分装 20μL，置于−20℃保存)。牙齿组织发育的随后阶段，还需要添加维生素 C (150μg/mL)[10] 以沉淀牙胶原。长时间培养时，培养液应该每 2~3 天更换一次。

(7) 单独培养时，上皮组织不如间质组织容易培养。细胞外基质可明显促进牙齿上皮生长。胶原蛋白曾被使用，但是目前最好的基质是基膜的膜基质——Matrigel，它可以促进上皮的形态发生[17]。组织用它包被后可以进一步促进上皮的生长。

(8) 有些细胞系不易形成聚集物。它们可以在 Eppendorf 中以 2000*g* 离心 2min，形成大的细胞团再转移到含有培养液的培养皿中 ，用无菌针头将其分成小块。

(9) 常用 BradU 法分析细胞增生(图 30.3B)。在固定之前(细胞增生试剂盒购于 381
Amersham Internation 或 Boehringer-Mannheim)，外植体常需要与 BradU 作用 0.5~3h。用冰冷甲醇固定后，PBS 冲洗，然后用抗 BradU 的抗体免疫染色[12,15]。

(10) 通常，组织在培养后就可以进行全固定分析 (图 30.3B~D)。全固定分析后，外植体再用明胶-白蛋白包埋，使用振荡切片机切成厚切片(200μm)，观察组织形态(如区别上皮与间质)。为了更详细研究组织形态，可以采用石蜡包埋进行系列切片(图 30.3E, F)。在大多数情况下，可以用含 4%的多聚甲醛(PFA)/PBS 溶液固定 1h；而 PFA 需要现用现

配(不要超过 7d)，整个免疫染色和原位杂交方法参考以往描述[12,13,16]。

(沈　政 译　刘为敏　王　莉 校)

参 考 文 献

[1] Trowell, O. A. (1959) The culture of mature organs in a synthetic medium. *Exp.Cell Res.* **16**, 118-147.

[2] Grobstein, C. (1953) Inductive epithelio-mesenchymal interaction in cultured organ rudiments of the mouse. *Science* **118**, 52-55.

[3] Saxén, I. (1973) Effects of hydrocortisone on the development *in vitro* of the secondary palate in two inbred strains of mice. *Arch. Oral Biol.* **18**, 1469-1479.

[4] Saxén, L., Lehtonen, E., Karkinen-Jääskeläinen, M., Nordling, S., and Wartiovaara,J. (1976) Morphogenetic tissue interactions: mediation by transmissible signal substances or through cell contacts? *Nature* **259**, 662,663.

[5] Nogawa, H. and Takahashi, Y. (1991) Substitution for mesenchyme by basement-membrane-like substratum and epidermal growth factor in inducing branching morphogenes is of mouse salivary epithelium. *Development* **112**, 855-861.

[6] Nogawa, H. and Ito, T. (1995) Branching morphogenesis of embryonic mouse lung epithelium in mesenchyme-free culture. *Development* **121**, 1015-1022.

[7] Rice, P., Aberg, T., Chan, Y.-S., Kettunen, P., Pakarinen, L., Max son, R.E., and Thesleff, I. (2000) Integration of FGF and TWIST in calvarial bone and suture development. *Development* **127**, 1845-1855.

[8] Saxén, L. (1966) The effect of tetracycline on osteogenesis *in vitro*. *J. Exp. Zool.***162**, 269-294.

[9] Thesleff, I., Lehtonen, E., Wartiovaara, J., and Saxén, L. (1977) Interference of tooth differentiation with interposed filters. *Dev. Biol.* **58**, 197-203.

[10] Partanen, A. M., Ekblom, P., and Thesleff, I. (1985) Epidermal growth factor inhibits tooth morphogenesis and differentiation. *Dev. Biol.* III, 84-94.

[11] Vainio, S., Karavanova, I., Jowett, A., and Thesleff, I. (1993) Identification of BMP-4 as a signal mediating secondary induction between epithelial and mesenchymal tissues during early tooth development. *Cell* **75**, 45-58.

[12] Jernvall, J., Aberg, T., Kettunen, P., Keranen, S., and Thesleff, I. (1998) The life history of an embryonic signaling center: BMP-4 induces p21 and is associated with apoptosis in the mouse tooth enamel knot. *Development* **125**, 161-169.

[13] Vaahtokari, A., Aberg, T., and Thesleff, I. (1996) Apoptosis in the developing tooth: association with an embryonic signalling center and suppression by EGF and FGF-4. *Development* **122**, 121-129.

[14] Mitsiadis, T., Muramatsu, T., Muramatsu, H., and Thesleff, I. (1995) Midkine (MK), a heparing-binding growth/differentiation factor, is regulated by retinoic acid and epithelial-mesenchymal interactions in the developing mouse tooth, and affects cell proliferation and morphogenesis. *J. Cell Biol.* **129**, 267-281.

[15] Kettunen, P., Laurikkala, J., Itäranta, P., Vainio, S., Itoh, N., and Thesleff, I. (2000) Associations of FGF-3 and FGF-10 with signaling networks regulating tooth morphogenesis. *Dev. Dyn.* **219**, 322-332.

[16] Laurikkala, J., Mikkola, M., Mustonen, T., et al. (2001) TNF signaling via the ligand-receptor pair.ectodysplasin and edar controls the function of epithelial signaling centers and is regulated by Wnt and activin during organogenesis, *Dev.Biol.* **229**, 443-455.

[17] Gittes, G., Galante, P, E., Hanahan, D., Rutter, W. J., and Debas, H, T. (1996) Lineage-specific morphogenesis in the developing pancreas: role of mesenchymal factors. *Development* **122**, 439-447.

第31章　细菌与宿主上皮在体外的相互作用

383

Nicola Jones, Mary H. Perdue, Philip M. Sherman,
Derek M. McKay

1　引言

最近几年,研究人员开始重新重视病原菌与共生细菌在疾病的发病机制及病理生理学方面的作用。例如，应用抗生素可以治疗很多人易患的Crohn氏病——一种主要的炎性肠道疾病[1]。传统观点认为，细菌对健康的影响主要由于其产生的毒素[如脂多糖(内毒素)、外毒素、肠毒素(如霍乱毒素、超抗原)]和(或)免疫细胞的激活。但是，现在已经很清楚地知道这些疾病是由于细菌与上皮直接作用后激活了上皮细胞的信号分子，改变了上皮的生理活性导致的。上皮细胞系与细菌共培养的结果显示，细菌黏附于结肠上皮细胞后使细胞一系列功能发生改变，包括离子转移、屏障功能，免疫介质、趋化因子的产生。这些免疫介质、化学因子参与并调节黏膜上皮的免疫反应[2~6]。事实上，细菌通过黏附直接作用于宿主细胞的现象是微生物学的一个新规律，被称为细胞微生物学[7]。

本章的目的是介绍细菌与模型上皮共培养的方法，描述检测二者相互作用的技术，如细菌对结肠上皮细胞骨架(紧密连接相关蛋白质)及上皮细胞渗透性、凋亡的影响。下列描述只针对非侵入细菌［如 EPEC (enteropathogenic *Escherichia coli*), *Helicobacter pylori*]；而不针对侵入性细菌［如沙门氏菌(*Salmonellae*)、痢疾杆菌(*Shigellae*)]，但是，这些基本的检测方法也可以用于评估其他细菌种类对上皮结构和功能的影响。

384

细胞微生物学是微生物学和细胞生物学特点相结合的科学[7]。许多资料表明，微生物或其产物对上皮细胞的信号和生理功能均有直接影响。本章主要描述宿主上皮与病原菌共培养的标准实验方法，概括了在没有其他细胞类型存在的情况下，用以描述细菌对上皮影响的上皮功能指标[2,13,29~32]，从而解决生理学家和微生物学家所面对的共同问题，即微生物(病原菌和共生有机体)与真核细胞之间的信息交流。在细胞微生物学的研究方面已经有许多进展，对这方面资料的综述无疑将使我们更好地理解细胞功能的调节和病理生理学机制，最终为防治传染病提供新的思路。

建议读者先阅读第29章，以便更好地理解本章的内容。

2　材料

2.1　上皮细胞与细菌的培养

研究细菌对上皮细胞的直接作用首先要注意两个基本问题：第一，研究的靶宿主器官是什么，属于何种上皮类型，常用的致病或非致病菌系有哪些？第二，研究的主要目

的是什么？后一个问题涉及模型上皮的选择，例如，只有少数细胞系能够形成适合研究离子转移的电学紧密的细胞单层，如人结肠获得的转化细胞系 T84 和 Caco-2。还有大量代表肺、肾、膀胱、肠上皮的细胞系，它们可以与一定的细菌种类相匹配，细菌可以在这些细胞系中形成集落或将其感染。例如，绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)和呼吸道上皮(人的 A549 上皮细胞系)[8];尿道致病大肠杆菌(Hu734 株)和泌尿膀胱上皮细胞(如 J82 或 MDCK 细胞系)[9]；结肠致病菌与肠分离的不同类型上皮细胞(如人的 T84、Caco-2、HT-29、KatoIII 或 AGS)[10]。

385

我们实验室经常用 T84(来源于人的结肠分离类隐窝细胞系)、KatoIII、AGS(人胃细胞系)、HEp-2(人喉细胞系)作为模式上皮细胞；研究大肠致病菌 *E.coli*(EPEC；E2348/6 原株，血清型 O127：H6)或 *H.pylori*(临床分离和适应鼠的 SS-I 株)对上皮细胞的直接作用。在 EPEC 感染的实验中，适宜的对照菌株包括非致病菌 HB101(O：粗糙型)和敲除等位基因 *eaeA*(栖息性 *E. coli*)的 E2348/6-CVD206。*H. pylori* 的适宜对照包括 *cagA*、*cageE* 和弯曲空肠杆菌，它们是编码毒素因子的等位基因突变体[11]。

2.1.1 上皮细胞的培养

(1) T84 培养基：1：1 的 DMEM 和 Ham's F12，另加 10%(*V*/*V*)FCS，1.5%(*V*/*V*)HEPES，2%(*V*/*V*)PS。

(2) MEM。

(3) RPMI。

(4) 1%(*V*/*V*)的二性霉素 B 作为抗生素。

(5) 200mol/L *L*-谷氨酰胺。

(6) 丁酸钠：按照 1~10μmol/L 加到培养液中，诱导人 Caco-2 细胞的表型从类隐窝向类绒毛细胞转变。

(7) 胰蛋白酶-EDTA。

(8) 无菌 PBS，pH7.4。

(9) 针对特定细胞添加生长因子(如表皮生长因子 EGF)。

(10) 塑料器皿：培养皿、6~12 孔培养板、组织培养瓶、Labtek 小室、移液头、15~50mL 的试管。

(11) 巴氏管。

(12) 带有微孔滤纸的转移皿(Costar)。滤纸大小、滤孔大小及滤膜成分主要根据实验目的而定。

2.1.2 细菌的培养

(1) EPEC：Columbia 血液琼脂板、Penassay 肉汤、肝琼脂板和消毒的 15mL 试管。

(2) *H. pylori*：Brucella 肉汤(Difco)，添加 10% FCS、10μg/mL 万古霉素、5μg/mL 增效磺胺；锥形瓶。如需储存，添加 10%的无菌甘油。

2.1.3 共培养

(1) 不含抗生素的 *E. coli* 培养基，该培养基与相应上皮细胞使用的培养基相同。

(2) *H. pylori* 培养基：相应上皮细胞培养基，添加 10μg/mL 万古霉素、5μg/mL 增效磺胺。 386

2.2 上皮细胞的形态与功能的分析

2.2.1 “黏附与消除”损伤(attaching and effacing lesion)

(1) 在 0.1mol/L Cacoylate 缓冲液中加入 2% 戊二醛 。

(2) 梯度乙醇(50%、70%、100%)。

(3) 树脂 EPONXY(Epon) 。

(4) 用乙醇溶解的饱和二氧乙酸盐液。

(5) 枸橼酸铅：先在 3mL 的沸水中加入 1.76g 枸橼酸钠和 1.33g 硝酸铅， 然后加入 8mL 的 1mol/L NaOH 和 12mL 沸水[33]。

2.2.2 丝状肌动蛋白

(1) 10%的中性福尔马林。

(2) 0.1%(*V/V*) TritonX-100 (Sigma)，用 PBS 配制。

(3) 2.5×10^{-6}mol/L FITC-环肽 (Molecular Probes)。

(4) 1 : 1 的甘油和 PBS。

(5) 甲醇。

(6) Bradford 微测量室(Bio-Rad)。

2.2.3 紧密连接及其相关蛋白

(1) 固定：甲醇或 4%多聚甲醛 PFA。

(2) 1%(*m/V*)BSA、0.1% (*V/V*) TritonX-100，用 PBS 配制。

(3) 紧密连接相关蛋白的一抗[如闭锁小带(ZO-1)，可以从商家均可买到]，按照 1: 200 稀释抗 ZO-1(Zymed Laboratories，San Francisco，CA)抗体。

(4) 冲洗缓冲液：PBS 或加入 0.1%的 Triton X-100 的 PBS。

(5) 加入标记有 FITC 或罗丹明或生物素第二抗体。

(6) DAB 浓度为 0.5mg/mL。

(7) 过氧化氢：

a. 去掉内源性过氧化物酶，在 200mL 100%的甲醇中加入 0.5mol/L HCl 配制 10mL 30% H_2O_2，在室温下温育 30min。

b. 在 95mL 色素底物中加入 10μL 30% H_2O_2。

(8) 染色盘。

(9) 移液器与吸头。

(10) 封埋剂(Permount, Fisher Scientific)和 Gel Mount™(Biomedia，Foster City，CA)。

2.2.4 .上皮细胞的钙离子流动

(1) 荧光染料：Indo-1 乙酸基甲基酯(AM), Furo-3AM(Molecular Probes),1~10μmol/L,

387 用 DMSO 溶解和培养液稀释。厂商会提供详细的使用说明以及相关的化合物特性。

(2) 10μmol/L 的钙离子载体 A23187，药理激动剂。

(3) 100μmol/L 的卡巴胆碱，胆碱能激动剂，生理激动剂。

(4) 重悬缓冲液：140mmol/L NaCl, 3mmol/L KCl, 1mmol/L $MgCl_2$, 1.5mmol/L $CaCl_2$, 5mmol/L 葡萄糖，以及 pH 7.4 的 10mmol/L HEPES。

2.2.5 单层上皮细胞渗透实验

(1) Ussing 小室 (WPI)。

(2) 多种管。

(3) 琼脂桥 (在 3mol/L KCl 的溶液中配制 3%琼脂或 3mol/L KCl 的溶液与平常使用的 Kreb 溶液按 1∶1 配制)。

(4) 电压 Q 钳 (型号 DVC-100:WPI)及与之匹配的放大器、甘汞电极。

(5) 热泵。

(6) 通风调节器。

(7) 图表记录或计算机记录系统。

(8) 5×10^{-5} mol/L 辣根过氧化物酶 (HRP) (II 型；分子质量大约 44kDa；Sigma)。

(9) 含有 0.003% (*V/V*) H_2O_2 的 PBS 和 80μg/mL *O*-邻苯二茴香。

(10) ^{3}H-甘露醇(分子质量 180Da; 6.5μCi/mL;10mmol/L 甘露糖醇)。

(11) ^{51}Cr-EDTA (分子质量 360Da；2.5μCi/mL；8.5μmol/L EDTA)，其中步骤(8)、(9)、(10)在上皮阻碍作用中起到标记分子的作用[见注意事项(1)]。

(12) 在 Tris 缓冲液加入 0.5mg/mL DAB/0.01% H_2O_2 (*V/V*)。

2.3 上皮细胞的凋亡

检测凋亡试剂盒[脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末段标记法(TUNEL)试剂盒]

2.3.1 透射电子显微镜(TEM)观察凋亡的形态

2%戊二醛。

2.3.2 荧光素染料染色鉴别凋亡

(1) 100μg /mL 吖啶橙乙二溴。

(2) 载玻片包被 APTEX(Fisher Scientific)或选择其他物质包被载玻片。

2.3.3 脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末段标记法(TUNEL)

(1) 无菌 PBS。

(2) 胰蛋白酶-EDTA。

(3) 二甲苯。

388 (4) 液体石蜡。

(5) 0.01% H_2O_2。

(6) 0.01mol/L 枸橼酸钠缓从液。

(7) 20μg/mL 蛋白激酶 K (Boehringer Manhein)。

(8) 末段转移酶缓冲液：200mmol/L 甲次砷酸钾，pH6.6 的 25mmol/L Tris-HCl，0.2mmol/L EDTA, 25mg/mL BSA。

(9) 1mmol/L 氯化钴。

(10) 0.01nmol/L 生物素 16-dUTP。

(11) 0.5U/μL 末段转移酶缓冲液。

(12) 终止液：300mmol/L NaCl，30mmol/L 枸橼酸钠。

(13) 亲和素过氧化物酶。

(14) 苏木精。

2.3.4 死亡细胞检测

酶联免疫吸附检测试剂盒(ELISA)检测 (Boehringer Manhein)。

2.4 主要设备

(1) 离心机。

(2) 电压表极其相关的电极。

(3) 无菌操作台。

(4) 无菌细胞培养箱。

(5) 细菌培养箱。

(6) 光学显微镜。

(7) 倒置光学显微镜。

(8) 细胞涡旋器(Shanndon Scientific Ltd.,Cheshire)。

(9) 水浴锅。

(10) 荧光分光光度计(型号 MPF-66；Perkin Elmer)。

(11) 放射闪烁计数器。

(12) 电子显微镜。

(13) 荧光显微镜。

3 方法

3.1 上皮细胞和细菌的生长

3.1.1 上皮细胞

(1) 上皮细胞在标准细胞培养皿中生长。不同的上皮细胞培养液稍有不同，读者应参考相应的文献；在我们的实验室主要使用的是 T84 细胞，培养液也是 T84 的培养液。

(2) T84 细胞一周传代一次，而快速生长的细胞可以一周传代二次(如 IEC4.1)。

(3) 接种在 transwell 滤器支持物上以后(虽然在我们的实验使用 10^6 个/mL，但是更低浓度也可以)，细胞在正常培养条件下培养(37℃、5%CO_2)。

389 (4) 每天或隔天换培养液一直到所需融合程度的细胞单层出现。

(5) 利用光学或相差显微镜观察细胞单层铺满情况。

(6) 在滤膜上生长的细胞单层的融合情况可以通过跨上皮电阻判断。电阻可以利用不对称电极电压表很容易地检测出来。

(7) 对于 T84 单层细胞，研究人员经常用≥800Ω/cm^2 作为合适的对照标准，但是对于 Caco-2 和 HT-29 细胞系则采用较低的电阻(250~400Ω/cm^2)。

3.1.2 细菌培养

3.1.2.1 EPEC

(1) 在实验前 24h，细菌应在 37℃ Penassay 肉汤中生长[见注意事项(2)]。

(2) 将细菌在 2500*g* 离心 15min。

(3) 用 PBS 重悬细菌，使菌落形成单位(CFU)达到 1×10^9。

(4) 在肝琼脂培养皿上进行 10 倍的梯度稀释，得到合适的 EPEC 浓度。

3.1.2.2 *H. pylori*

(1) 细菌培养在 Columbia 的血琼脂板上，在微氧条件下 37℃培养 72h [见注意事项(2)]。

(2) 用 Brucella 肉汤重悬细菌，进行感染实验。

(3) 三角瓶震荡过夜。

(4) 离心后，用 PBS 重悬使细菌浓度达到 1×10^{9}CFU/mL。

3.1.3 建立共培养体系

(1) 上皮细胞与大肠杆菌培养或上皮细胞与含有万古霉素和增效磺胺的 *H.pylori* 培养，在培养前用不含抗生素的无菌培养液(培养液与相应细胞匹配)将上皮细胞洗 3 次(10~20s)。

(2) 在 1mL 培养液(含或不含抗生素)中加入 50μL 的细菌悬液(含一定浓度的细菌)，然后加到上皮表面。

(3) 将培养皿轻摇 10s，促进细菌的扩散。

(4) 共培养物在 37℃孵育 3~24h[见注意事项(3)]。

(5) 用吸管轻轻吸去没有黏附的细菌。

(6) 用适当的培养液冲洗 2~3 次。

(7) 进一步观察上皮的变化(见 3.2)。

390 (8) 检测细菌对上皮的影响是由于细菌的黏附还是由于细菌分泌的产物造成的，是非常重要的。可以通过以下手段进行分析：

a. 用死细菌进行共培养实验。

b. 将未使用过的上皮与细菌类似物或只含细菌分泌物的滤过培养液一起培养[见注意事项(4)]。

c. 依据 2.1，采用经遗传改变的细菌种类，它们缺乏形成特定结构(如黏附)和生成产物(如毒素)的能力[11,12]。

3.2 上皮细胞的形态和功能的分析

3.2.1 “黏附和消除”损伤

EPEC 通过肠细胞表面的叶状突起物与上皮细胞紧密相连，损害微绒毛的正常模式，这被称为黏附和消除(A/E)损伤[13,14]。使用透射电镜可以清楚观察上皮的 A/E。在 37℃，用细菌感染上皮细胞 6h。

(1) 用 PBS 冲洗 4~6 次，去掉没有黏附的细胞。

(2) 如果上皮细胞是在塑料皿中培养，轻轻用细胞刷刮起，然后 1000*g* 离心 10min。

(3) 先用 2%戊二醛固定，然后用 2%锇酸四氧化物固定。

(4) 在滤纸上生长的上皮细胞，从塑料支持物上去掉，像上面第二步方法固定上皮细胞。

(5) 用 50%~100%的乙醇逐级脱水。

(6) EPONXY 树脂进行包埋。

(7) 切片厚度为 50~60nm，将其置于铜网。

(8) 用乙酸双氧铀和枸橼酸铅染色，以后步骤按照制作电子显微镜(EM)切片进行。

(9) 在 60kV 用 EM 观察变化[14]。

(10) 另外制备的上皮用扫描电子显微镜(SEM)进行观察，方法同 EM。

3.2.2 丝状肌动蛋白

A/E 损伤伴有细胞骨架蛋白在损伤下的积累。紧密连接相关蛋白与丝状肌动蛋白相耦联[13]。据推测，肌动蛋白-肌球蛋白的收缩-松弛可以通过分开和对折紧密连接来调节细胞旁渗透性(见 3.2.3)。真菌分离蛋白、环肽与 F-肌动蛋白结合，通过加入或去掉 G 肌动蛋白单体来阻止其发生进一步改变。因此可以用 FITC-环肽来鉴别 F-肌动蛋白的分布。

(1) 在室温下，用 10%的中性缓冲液配置的福尔马林固定上皮 20~30min。

(2) 0.1%的 TritonX-100 孵育 5min 提高样品的通透性。

(3) 在暗处，将 FITC-环肽与上皮共同孵育 30min。

(4) 用 PBS 冲洗 3 次。

(5) 用 1∶1 的甘油和 PBS 包埋，用免疫荧光或激光共聚扫描显微镜观测。

(6) 除了用于观察，还可以量化细胞总的 F-肌动蛋白。用同样的方法处理单层，但是不要使用 FITC-环肽。在暗处，单层用 100%的甲醇 37℃提取 1h。

(7) 提取物应快速吹打。

(8) 移入比色管进行测定，激发光波长是 465nm，发射光波长为 535nm(10nm 裂隙)。

(9) 根据 Bradford 蛋白微测定法记录数据，用每克总蛋白质的荧光作计量单位 [见注意事项(5)]。

3.2.3 紧密连接相关蛋白

上皮细胞紧密连接可以调节细胞旁的渗透通路。对于这个结构具体的“密封”特性目前尚无定论。目前紧密连接的模型是相邻细胞的 occludin 与 claudin 蛋白经由胞质蛋白

391

(如 ZO-1 及其他)与肠细胞肌动蛋白骨架互相锁定[15]。细菌黏附或其产物对紧密连接相关蛋白的影响可以采用商业抗体或间接免疫细胞化学方法来检测[2,12]。

(1) 在细菌存在或不存在的条件下，在滤膜支持物上培养单层。

(2) 用 PBS 洗 3 次。

(3) 用 100%的冷甲醇固定 10~20min (根据一抗生产厂商的要求，也可选择其他固定方法，如 4% PFA 等)。

(4) 用 PBS 冲洗单层细胞，然后在含有 1% BSA/0.1% Triton 的 PBS 中孵育 5min。

(5) 用含有 1% BSA/0.1% Triton 的 PBS 稀释一抗(如 ZO-1 稀释为 1∶200),孵育 1~4h。

(6) 用含有 0.1% Triton 的 PBS 冲洗 3 次,将上皮细胞在适当的特异二抗 (稀释为 1∶100)中孵育 1~4h，用含有 0.1%的 Triton 的 PBS 冲洗 3 次[见注意事项(5)]。

(7) 用含有 0.1% Triton 的 PBS 冲洗 3 次，将单层细胞从塑料支持物中析出。

(8) 用诸如 Gel Mount^{MT} 等封埋剂固定细胞，在荧光显微镜或激光共聚焦显微镜观察[2]。

392

(9) 在举的例子中使用了生物素标记的二抗(在文献记载中不很普遍)，紧密连接相关蛋白的可以通过抗生物素结合过氧化物酶和 DAB 反应或与其他显色剂作用后，在光镜下观察。标准的免疫组织化学方法的具体步骤由一抗和(或)二抗的生产厂商提供。

基本的免疫组织化学方法要针对不同的研究项目来优化[见注意事项(6)]。

3.2.4 上皮细胞的钙离子流动

许多文献都描述了由细菌引起的上皮细胞信号分子的改变，如 IP_3、钙离子、蛋白激酶 C 等[16,17]。可以首先选择 Ca^{2+} 选择性的荧光指示剂，如 Indo-1 乙酸基甲基酯(AM)或 Furo-3-AM 来评估上皮细胞$[Ca^{2+}]_i$的反应。指示剂经胞浆脂酶水解可滞留在胞内。

(1) 在暗处，将细胞与具有渗透能力的 Ca^{2+} 指示剂孵育，37℃。1h。

(2) 用新鲜的培养液洗 3 次，洗去未结合的荧光染料。

(3) 作用后，刮出细胞，150*g* 离心 10s。

(4) 用 1mL 的重悬液悬浮细胞至一定浓度(如 10^5)，置于比色管中。

(5) 在 37℃不断涡旋，用 340nm 激发光和 410nm 发射光下的分光光度计测量。

(6) 通过这种方式，可以测定基础 Ca^{2+} 的含量，再向比色管中添加 A23187 或卡巴胆碱可以检测刺激后的 Ca^{2+} 反应[16]。

3.2.5 上皮单层的渗透性

抗原或其他潜在的毒性物质可以通过细胞旁路(经紧密连接、在细胞间移动)或穿细胞通路(直接穿过细胞质)跨过上皮细胞。上皮的细胞旁或穿细胞渗透性可以采用选择性标记分子的流量试验(±定位试验)来测定。这些标记性分子会优先选择一条或其他通路。如 ^{51}Cr-EDTA 和 ^{3}H-甘露醇是已经被认可的细胞旁渗透的标记分子；而穿上皮细胞转移的较大抗原蛋白，如 HRP，通常更能够反映穿细胞转运[18]。对 Ussing 小室中包埋的 T84 单层细胞的上皮渗透性的评估已经在第 29 章作了介绍(McKay 和 Perdue)；而研究 HRP 的穿上皮细胞流动则可以在 Ussing 小室或 Transwell 中直接进行。

393

(1) 将 HRP(5×10^{-5}mol/L)加到上皮细胞顶层的缓冲液或培养液中。

(2) 平衡 30min。

(3) 每隔 30min 从浆膜缓冲液中取 500μL，共 1.5h。

(4) 加入等体积的初始缓冲液。

(5) 随后将 150μL 的样品与 800μL 的磷酸缓冲液混合，缓冲液中包含 0.003%的 H_2O_2 和 80μg /mL 的 *O*-邻苯二茴香。

(6) 将溶液移至比色管中，用 2min 内 460nm 测定的光密度增加率来计算 HRP 浓度。流率可以计算并用 pmol · cm^2 · h 表示[19]。数据还可以用添加到单层顶部 HRP 最初含量的回收百分比来表达。

(7) HRP 的电子很密集，可以用 TEM (见 3.3.1) 观察其通过上皮细胞的路径。

(8) 上皮单层细胞经 HRP 处理 60min 或更短的时间后，被固定，再与 0.5mg/mL DAB 和 0.01% (*V/V*) 的 H_2O_2 作用，用于 DAB 细胞化学检测。

(9) 样品脱水，用 Epon 包埋，超薄切片用乙酸铀酰和枸橼酸铅染色。

(10) 在 TEM 下观察、照相。

(11) 对细胞旁间隙 HRP 的评估可以在存在或缺失基础上完成，含有 HRP 的包含体(数目和面积)可以在一定面积内确定 (如一个上皮细胞或细胞核顶部 5×5μm 区域)[19]。

3.3 上皮细胞的凋亡

细胞死亡通过两种方式进行，凋亡和坏死，前者称为程序性死亡。有许多因素可以诱导凋亡，其主要特征为胞壁周围出现空泡，染色体浓染(如凋亡小体的形成)。直接观察细胞及细胞核的形态(TEM、荧光染色)，并结合其他技术(如 TUNEL 或 ELISA)可以计算在培养皿、载玻片或滤膜上生长的单层细胞凋亡的数目[21~23]。

3.3.1 用透射显微镜评估凋亡细胞的形态

(1) 上皮细胞长满后，与细菌在不同的感染途径和不同的时间段进行共培养[见注意事项(8)]。

(2) 感染后，用胰蛋白酶将上皮细胞从它们的支持物上消化下来。

(3) 用 2%的戊二醛固定，然后用透射显微镜观测。 394

(4) 凋亡细胞很容易根据形态来鉴别[见注意事项(9)](图 31.1)。

3.3.2 荧光染色确定凋亡

(1) 感染后，用胰蛋白酶将上皮细胞从培养皿中或微孔滤纸上消化下来，然后用 1mL 的 PBS 重悬，同时加入 100μg/mL 吖啶橙乙二溴。

(2) 温育 10~20min，将细胞样品(大约 10^5)进行涡旋 2min[<100*g*(300r/min)]，置于 APTEX 覆盖的载玻片。

(3) 盖上盖玻片，用荧光显微镜观察 [见注意事项(10)]。 395

(4) 在随机选择的显微视野中计算绿色荧光阳性的细胞，即凋亡细胞。

3.3.3 脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末段标记法(TUNEL)

(1) 在进行 TUNEL 之前，根据上皮细胞是生长在塑料或滤膜上选择不同的样品制备

方法。

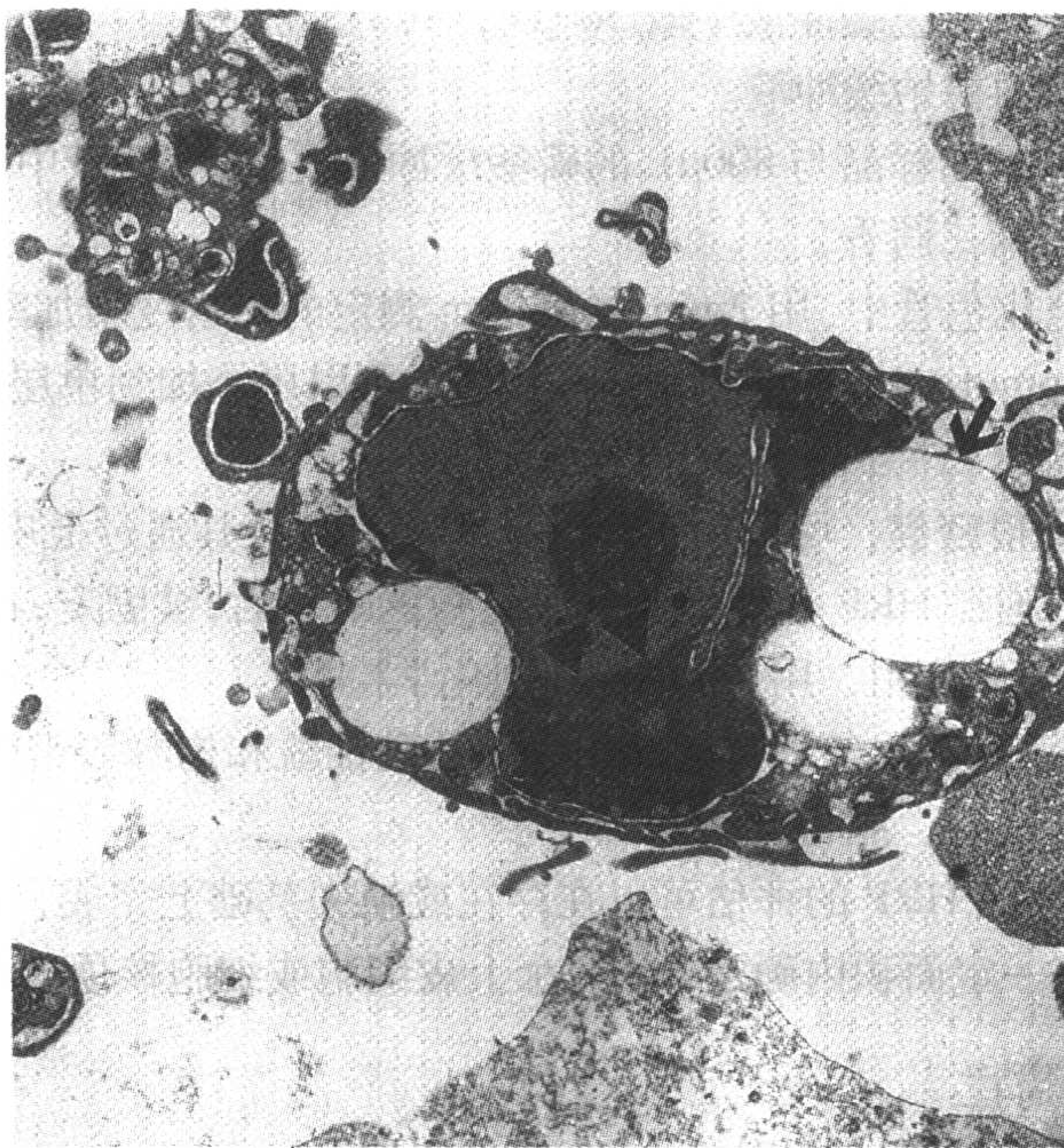


图 31.1 透射电镜观察 HEp-2 细胞凋亡显微照片

凋亡主要特征有胞质出现空泡，染色加深，同时染色体浓染且边移，核膜膨大可见(放大倍数，×12 000)

(2) 在前面的实验中，与细菌作用后，上皮细胞将用无菌的冷 PBS 冲洗。

(3) 用胰蛋白酶-EDTA 消化，细胞计数。

(4) 将 1×10^5~5×10^5 细胞置于 APTEX 包被的载玻片。

(5) 室温下，干燥 30min。

(6) 用 10%的中性甲醛缓冲液固定 10~20min。

(7) 在滤膜上生长的细胞单层，用 PBS 冲洗后，可以在 Transwell 中直接固定。

(8) 用梯度乙醇脱水。

(9) 将细胞单层及滤膜与培养孔分开。

(10) 用二甲苯清洗，石蜡包埋，切片。

(11) 切片置于 APTEX 包被的载玻片。

(12) 离心后的上皮细胞或细胞单层切片可按照 TUNEL 实验要求处理。

(13) 用 0.01%的 H_2O_2 温育 30min 阻断内源性过氧化物酶。

(14) 此步骤为抗原修复：样品在 0.01mol/L 的枸橼酸钠缓冲液中用强微波处理 1min[见注意事项(11)]。

(15) 在室温下，切片在含有蛋白激酶 K 的 PBS 中处理 15min。

(16) 用蒸馏水冲洗 3 次，每次 2min。

(17) 室温下，在末端转移酶缓冲液中孵育 5min。

(18) 在转移酶中添加氯化钴、生物素 16-dUTP，末端转移酶，37℃温育 60min。

(19) 用终止液终止反应。

(20) 利用亲和素标记的过氧化物酶和 DAB 反应观察颜色变化[24,25]。

(21) 用苏木精复染，Permount 固定。

(22) 镜检并计数每个单层或每次处理的离心细胞中的凋亡细胞［见注意事项(5)和(6)]。

3.3.4 通过免疫实验鉴别细胞死亡

凋亡的主要特征就是 DNA 出现碎片[26,27]，与组氨酸结合形成寡核小体，这样可以用来定量检测。下面介绍检测细胞凋亡的 ELISA 试剂盒[24]。

396

(1) 感染的上皮细胞，通过胰蛋白酶消化后，用裂解液进行裂解。

(2) 4000*g*(14 000r/min)离心 10min。

(3) 用高浓度的糖皮质激素处理 T 细胞[28]或用山梨糖醇处理的 HEp-2 细胞(1mol/L 在 37℃、2h[24])作为阳性对照；将细胞置于−20℃，1h 后，取出融化，作为坏死细胞对照。

(4) 用抗生蛋白链菌素包被 96 孔微量板，加入一系列细胞裂解液上清(如 1∶4、1∶16、1∶64)。

(5) 温育后，加入生物素标记的抗组氨酸的抗体以及过氧化物酶标记的抗 DNA 抗体检测组氨酸结合的寡核小体。

(6) 根据厂商提供的组氨酸-DNA 复合物制定标准曲线。

(7) 通过分光光度计测定样品吸收值。

通过 3.2 所述方法，我们和其他研究者认为细菌黏附肠上皮细胞导致上皮 Ca^{2+}改变，使上皮细胞 F-肌动蛋白细胞骨架重新组装，同时 ZO-1 的分布受到破坏，降低上皮的阻碍功能，诱导细胞发生凋亡[2,12,16,24,25]。

4 注意事项

(1) 在实验中，可以选择一系列的标记分子和探针，包括 ^{3}H-met-leu-phe(细菌的三肽)，不同分子质量的 ^{14}C-PEG、菊粉、BSA、荧光素标记葡聚糖(有多种型号可以选择：Molecular Probes)。

(2) 为了更快诱导 A/E，EPEC 可以在最佳条件下在肉汤中生长 3h 就进入对数生长[11]。如果没有微氧培养箱，*H.pylori* 也可以在厌氧罐中生长。为了在罐中得到微氧环境，可以用微氧包[如“Campy 包”(BBL Microbiology Systems，Microbiology,ON,Canada)]；另外一种方法是向密封的容器中充入微氧气体混合物。使用前要在光镜下检查 *H.pylori* 悬浮液中有机体的活力，还要将其在微氧条件下在琼脂皿上培养，以排除污染。EPEC 和 *H.pylori* 都可以在含 10%甘油的细菌培养基中，在−70℃下长期保存。

(3) 要小心避免 12 孔培养板中对照上皮细胞的污染，更重要的是不要污染实验室的储备上皮细胞系。建议指定一个专门用于细菌培养的培养箱。进一步的防污染措施包括使用 Perspex 分离箱(大约 12cm×22cm×28cm)，它有可密封的 CO_2/O_2 入口，可以将含有上皮与细菌共培养物的 transwell 置于其中再放入培养箱。一旦细菌被加到上皮细胞培养物的顶面，千万要注意不要污染对照上皮。实验前(如感染后 3~24h)，研究人员要在有氧条件下在 37℃培养对照上皮的培养液 24h，以确认没有污染。

397

(4) 3000g 离心过夜培养的肉汤培养物 15min，再通过 0.2μm 孔径的滤器过滤就可得到无菌培养液 [12,29]。细菌还可以用 γ 射线[13]，或抗生素杀死，如用卡那霉素去除 *E.coli*[12,13]；用吉他霉素去除 *H.pylori*[30]，用无菌的 PBS 清洗并重新悬浮。为了避免无其他细菌污染，处理后的样品应培养在适合特定细菌生长的最佳环境中。

(5) 对于免疫组织化学实验，要确保所有样品与一抗和二抗的作用时间相同。建议每次实验不超过 12 个样品，确保样品的抗体加入时间不超过 1min，这对于孵育时间较短(如 45~60min)的实验尤其重要。在检测滤纸上的培养上皮时，建议使用透明的聚酯滤器支持物(Costar)。从支持物上取下滤纸后，要将其包埋在水性基质中，覆盖盖玻片，边缘用指甲油封闭，以防干燥。

(6) 免疫组织化学检测的优化步骤包括：① 改变抗体孵育时间和冲洗次数；② 一抗或二抗稀释比例；③ 固定剂的选择；④ 抗原的修复，如酶的消化、对缓冲液热修复、枸橼酸钠-EDTA 缓冲液等；⑤ 使用血清阻断非特异性结合。

(7) 对于在滤纸培养的单层上皮细胞也可以应用胰蛋白酶消化。上皮细胞在透明聚酯滤纸(孔径 1.0μm)生长至融合，用细菌感染一定时间，然后用荧光燃料处理。小心从塑料支持物上取下滤膜，置于含有生理缓冲液的比色管中检测 Ca^{2+}的反应。

(8) 凋亡发生时，单层上皮细胞容易脱落并悬浮起来。因此脱落的细胞也应该包含在样品中，否则对凋亡的程度会估计不足。

(9) 细胞核变化是检测凋亡形态变化的早期特征[21]。凋亡细胞具有在核膜内表面的浓缩并边缘排列的染色体。胞膜有起泡形成，胞质也浓缩并形成空泡。但细胞质中细胞器保持完整。可以观察到细胞和细胞核芽殖形成凋亡小体。在体外凋亡细胞最终随着细胞膜的破裂和与坏死相似的细胞器破坏而最终降解。但是凋亡细胞进行的继发坏死与"真正的"原发坏死不同，可根据以上描述的细胞核特征鉴别。

(10) 凋亡细胞可以通过绿色荧光、减小的细胞体积、浓缩的强荧光细胞核、存在或不存在核碎片来鉴定[24,25]。通过比较，坏死细胞发出橙色荧光，细胞胀大并伴有核染色体的絮状沉积。发生继发坏死的凋亡细胞也发出橙色荧光。但是通过观察细胞核的浓缩和碎片仍然可以与原发坏死细胞相区别。额外的细胞渗透和非渗透染色也可用于区别凋亡细胞和坏死细胞，主要试剂为 DAPI、HOESCHT 和碘化丙锭(PI)。除了用荧光显微镜技数细胞，凋亡程度还可以在 DNA 染色后用流式细胞仪来测定。

(11) 也可以采用其他修复技术，包括在 37℃用 0.05%(m/V)的胰蛋白酶处理 30min[20]或在 0.01mol/L 枸橼酸钠缓冲液 (± 1mmol/L EDTA, pH8.0)中用强处理抗原 1min。

致谢

该研究在作者的实验室完成，项目基金由 CIHR、CAG、CCFC、CDDF 提供，N.L.J. 获得美国胃肠病学协会提供研究经费。

(沈 政 译 刘为敏 王 莉校)

参 考 文 献

[1] Peppercorn, M. A. (1997) Antibiotics are effective therapy for Crohn' s disease. *Inflam. Bowel Dis.* **3**, 318-319.

[2] Philpott, D. J., McKay, D. M., Sherman, P. M., and Perdue, M. H. (1996) Infection of T84 cells with enteropathogenic *Escherichia coli* alters barrier and transport functions. *Am. J. Physiol.* (*Gastrointest. Liver Physiol.*) **270**, G634-G645.

[3] Collington, G. K., Booth, I. W., and Knutton, S. (1998) Rapid modulation of electrolyte transport in Caco-2 cell monolayers by enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) infection. *Gut* **42**, 200-207.

[4] Song, F., Ito K., Denniong, T. L., et al. (1999) Expression of the neutrophil chemokine KC in the colon of mice with enterocolitis and by intestinal epithelial cell lines: effects of flora and pro-inflammatory cytokines. *J. Immunol.* **162**, 2275-2280.

[5] Kagnoff, M. F. and Eckmann, L. (1997) Epithelial cells as sensors for microbial infection. *J. Clin. Invest.* **100**, 6-10.

399

[6] Weinrauch, Y. and Zychlinsky, A. (1999) The induction of apoptosis by bacterial pathogens. *Annu. Rev. Microbiol.* **53**, 155-187.

[7] Cossart, P., Boquet, P., Normark, S., and Rappouli, R. (1996) Cellular microbiology emerging. *Science* **271**, 315-315.

[8] Harder, J., Meyer-Hoffert, U., Teran, L. M., Schwichtenberg, L., Bartels, J., and Schroder, J. M. (2000) Mucoid *Pseudomonas aeruginosa*, TNFα, IL-1ß, and IL-6 induce human β -defensin-2 in respiratory epithelia. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.***22**, 714-721.

[9] Agace, W., Hedges, S., Andersson, U., Andersson, J., Ceska, M., and Svanborg, C. (1993) Selective cytokine production by epithelial cells following exposure to *Escherichia coli. Infect. Immun.* **61**, 602-609.

[10] Jung, H. C., Echmann, L., Yang, S.-K., Panja, A., Fierer, J ., Morzycka- Wroblewska,E., and Kagnoff, M. K. (1995) A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J. Clin.Invest.* **95**, 55-65.

[11] Jones, N. L. and Sherman, P. M. (1999) *Helicobacter pylori*-epithelial cell interactions: from adhesion to apoptosis. *Can. J. Gastroenterol.* **13**, 563-566.

[12] Philpott, D. J., McKay, D. M., Mak, W., Perdue, M. H., and Sherman, P. M. (1998)Signal transduction pathways involved in enterohemorrhagic *Escherichia coli* induced alterations in T84 epithelial permeability. *Infect. Immun.* **66**, 1680-1687.

[13] Rosenshine, I., Ruschowski, S., Stein, M., Reinschild, D. J., Mills, S. D., and Finlay,B. B. (1996) A pathogenic bacterium triggers epithelial signals to form a functional receptor that mediates actin pseudopod formation. *EMBO J.* **12**, 2613-2624.

[14] Goosney, D. L., de Grado, M., and Finlay, B. B. (1999) Putting *E. coli* on a pedestal: a unique system to study signal transduction and the actin cytoskeleton. *Trends Cell Biol.* **9**, 11-14.

[15] Tsukita, S., Furuse, M., and Ito,h M. (1999) Structural and signaling molecules come together at tight junctions. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**, 628-633.

[16] Ismaili, A., Philpott, D. J., Dytoc, M. T., and Sherman, P. M. (1995) Signal transduction responses following adhesion of verocytotoxin producing *Escherichia coli. Infect. Immun.* **63**, 3316-3326.

[17] Foubister, B., Rosenshine, I., and Finlay, B. B. (1994) A diarrheal pathogen, enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), triggers a flux of inositol phosphates in infected epithelial cells. *J. Exp. Med.* **179**, 993-998.

[18] Travis, S. and Menzies, I. (1992) Intestinal permeability: functional assessment and significance. *Clin. Sci.* **82**, 471-488.

[19] Berin, M. C., Yang, P.-C.,Ciok, L., Waserman, S., and Perdue, M. H. (1999) Role of IL-4 in macromolecular transport across intestinal epithelium. *Am. J. Physiol.* (*Cell Physiol.*) **276**, C1046-C1052.

[20] Green, D. R. (2000) Apototic pathways: paper wraps stone blunts scissors. *Cell* **12**, 1-4.

[21] Kerr, J. F. R., Gobe, G. C., Winterford, C. M., and Harmon, B. V. (1995) *Ana-tomical methods in cell death. Methods Cell Biol.* **46**, 1-26.

[22] Ben-Sasson, S. A., Sherman, Y ., and Oarvrieli, Y. (1995) Identification of dying cells-*in situ* staining. *Methods Cell Biol.* **46**, 29-39.

400

[23] Jones, N. L., Shannon, P. T., Cutz, E., Yeger, H., and Sherman, P. M. (1997) Increase in proliferation and apoptosis of gastric epithelial cells early in the natural history of *Helicobacter pylori* infection. *Am. J. Pathol.* **151**, 1695-1703.

[24] Jones, N. L., Islur, A., Haq, R., et al. (2000) *Escherichia coli* Shiga toxins induce apoptosis in epithelial cells that is regulated by the Bcl-2 family. *Am. J. Physiol.(Gastrointest. Liver Physiol.)* **278**, 0811-0819.

[25] Jones, N. L., Day, A. S., Jennings, H., and Sherman, P. M. (1999) *Helicobacter pylori* induces gastric epithelial cell apoptosis

in association with increased Fas receptor expression. *Infect. Immun.* **67**, 4237-4242.

[26] Nagata, S. (2000) ApOptOtic DNA fragmentation. *Exp. Cell Res.* **256**, 12-18.

[27] Aragene, Y ., Kulms, D., Metze, D., Wilkes, O., Poppelmann, B., Luger, T. A, and Schwartz, T. (1998) Ultraviolet light induces apoptosis via direct activation of CD95 (F AS) independently of its ligand CD95L. *J. Cell Biol.* **140**, 171-182.

[28] Ashwell, J. D., Lu, F. W., and Vacchio, M. S. (2000) Glucocorticoids in T cell development and function. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 309-345.

[29] Philpott, D. J., Yamaoka, S., Israel, A., and Sansonetti, P. J. (2000) Invasive *Shigella flexneri* activates NF-κB through a lipopolysaccharide-dependent innate intracellular response and leads to IL-8 expression in epithelial cells. *J. Immunol.***165**, 903-914.

[30] Haeberle, H. A., Kubin, M., Bamford, K. B., et al. (1997) Differential stimulation of interleukin-12 (IL-12) and IL-l0 by live and killed *Helicobacter pylori in vitro* and association of IL-12 production with γ-interferon producing T cells in human gastric mucosa. *Infect. Immun.* **65**, 4229-4235.

[31] Ismaili, A., Philpott, D. J., McKay, D. M., Perdue, M. H., and Sherman, P. M. (1998) Epithelial cell responses to shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection, p. 213-225. In *Excherichia coli* 0157: H7 *and other shiga toxin-producing E. coli strains*.(Kaper,J.B.and O'Brien,A.D.,eds.).American Society for Microbiology, Washington, DC.

[32] McKay, D. M. (1999) Intestinal inflammation and the gut microflora. *Can. J.Gastroenterol.* **13**, 509-516.

[33] Reynolds, E. (1963) Preparation of material for electron mircoscopy. *J. Cell Biol.***17**, 208-212.

索　引

各词条后面的数字系英文版原书页码，这些页码已在正文页边的空白处标出，可对应查找。